

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



TESIS DOCTORAL

Estudio de rasgos de virulencia y análisis proteómico de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de suplementos dietéticos y probióticos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carolina Teresa Hernández Haro

Directoras

María Molina Martín
Lucía Monteoliva Díaz

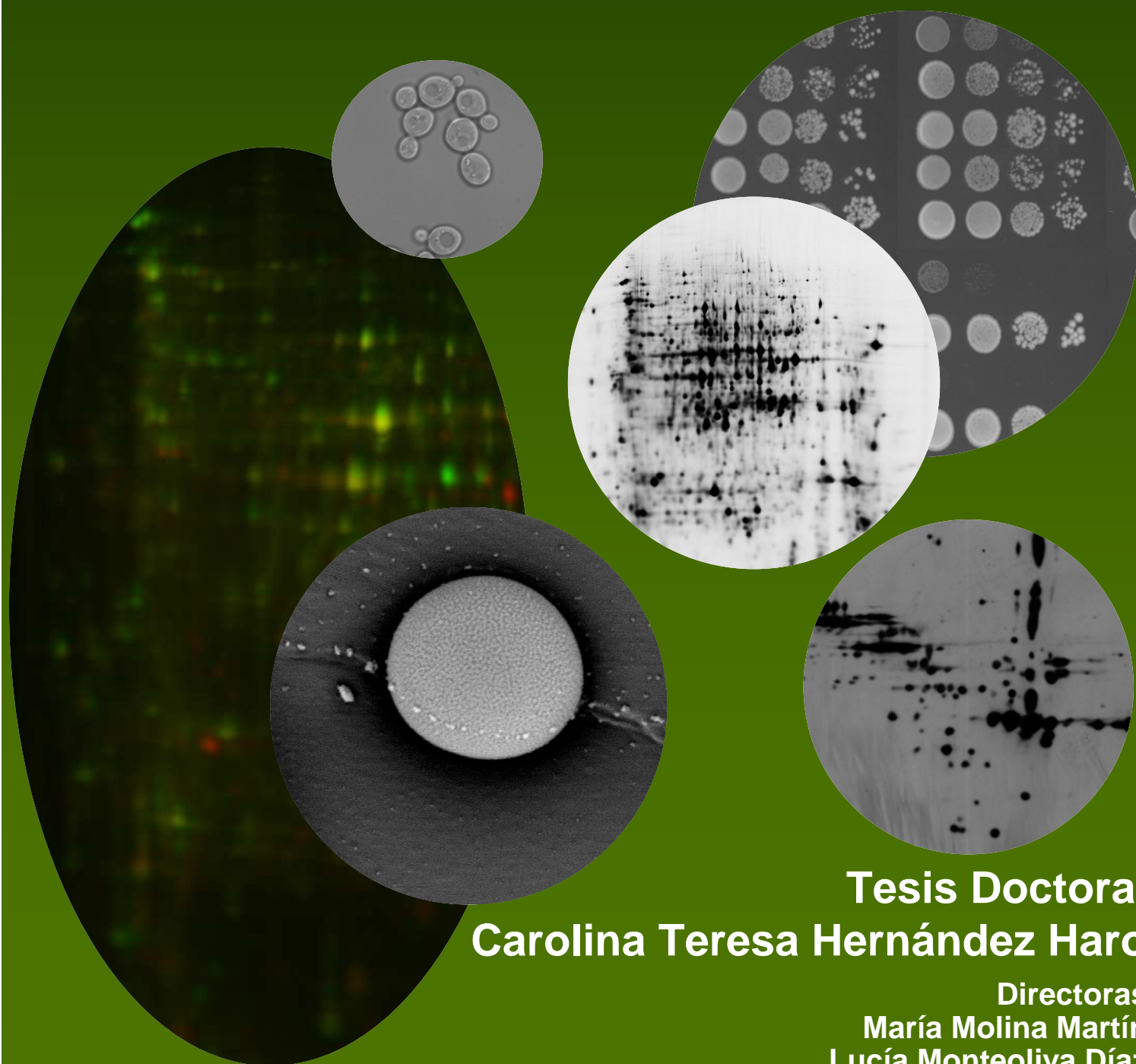
Madrid, 2014



Programa de doctorado de Microbiología y Parasitología
Departamento de Microbiología II
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid

Madrid, 2013

ESTUDIO DE RASGOS DE VIRULENCIA Y ANÁLISIS PROTEÓMICO DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* AISLADAS DE SUPLEMENTOS DIETÉTICOS Y PROBIÓTICOS



Tesis Doctoral
Carolina Teresa Hernández Haro

Directoras
María Molina Martín
Lucía Monteoliva Díaz

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



ESTUDIO DE RASGOS DE VIRULENCIA Y ANÁLISIS
PROTEÓMICO DE CEPAS DE
Saccharomyces cerevisiae AISLADAS DE
SUPLEMENTOS DIETÉTICOS Y PROBIÓTICOS

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por

DÑA. CAROLINA TERESA HERNÁNDEZ HARO

DIRECTORAS:

DRA. MARÍA MOLINA MARTÍN

DRA. LUCÍA MONTEOLIVA DÍAZ

**D^a. CONCHA GIL GARCÍA, Directora del Departamento de Microbiología II
de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid**

CERTIFICA: Que D^a. **CAROLINA TERESA HERNÁNDEZ HARO** ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid el trabajo que se presenta para optar al grado de Doctor con el título: **“Estudio de rasgos de virulencia y análisis proteómico de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de suplementos dietéticos y probióticos”**, bajo la dirección de las doctoras **MARÍA MOLINA MARTÍN y LUCIA MONTEOLIVA DÍAZ**.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Madrid, 2013

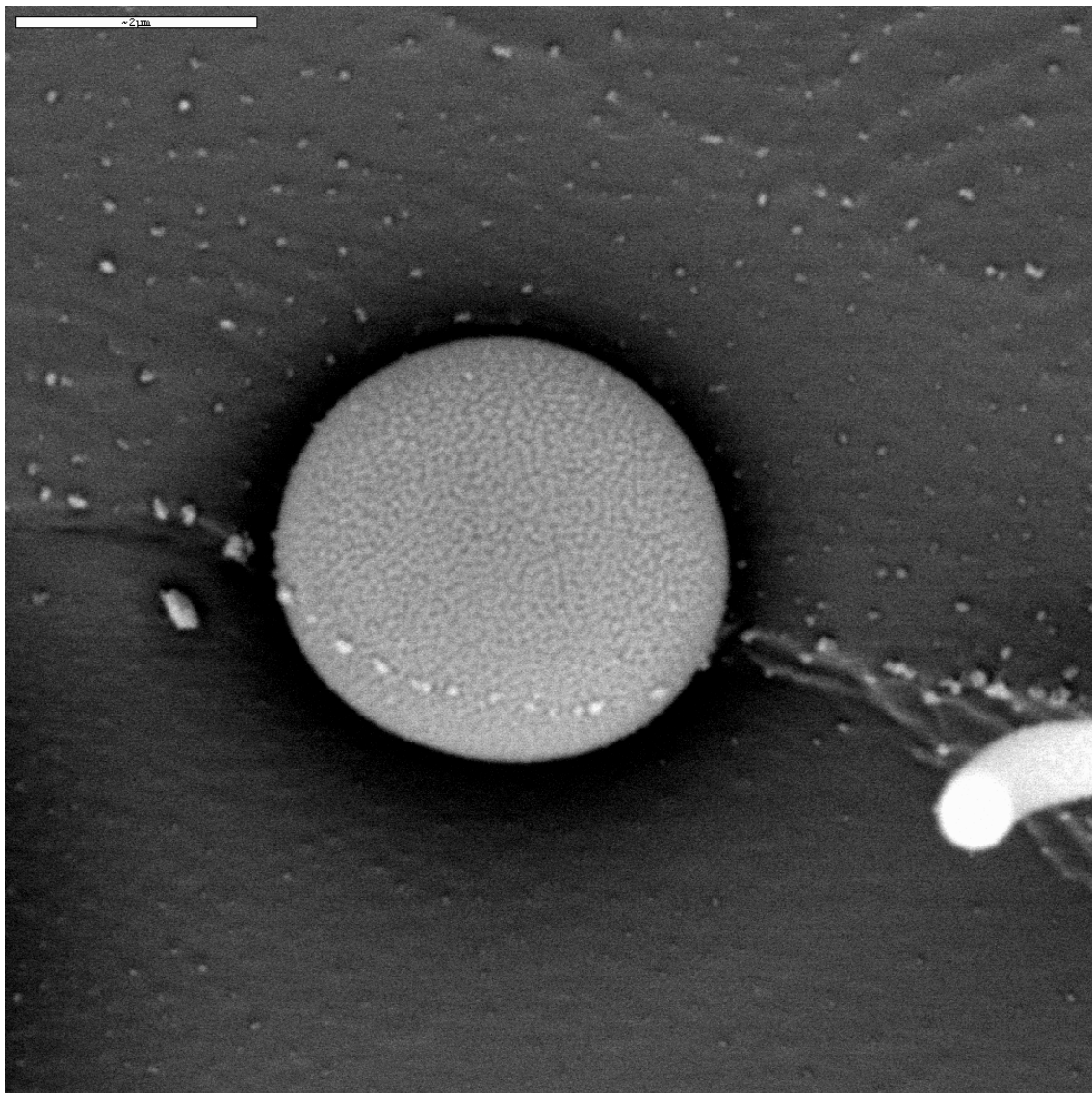
Fdo. Catedrática D^a Concha Gil García

Este trabajo ha sido financiado por:

- Proyecto: "Identificación de genes asociados con la virulencia en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de suplementos dietéticos y probióticos" de la comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) del Ministerio de Educación y Ciencia. AGL2006-12710-C02-02/ALI.
- Proyecto: "Red española de investigación en patología infecciosa (REIPI)" del Instituto de Salud Carlos III. RD06/0008/1027.
- Proyecto: "Interacción *Candida albicans*-hospedador: Aproximaciones proteómicas globales para el diagnóstico, tratamiento e inmunoprevención de las candidiasis invasivas" del Ministerio de Ciencia e Innovación. BIO2009-07654.

La doctoranda ha sido financiada por:

- Beca del Programa Nacional de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Educación y Ciencia asociada al proyecto AGL2006-12710-C02-02/ALI, desde Julio de 2007 hasta Octubre de 2011.
- Ayuda concedida por la "Cátedra de Genómica y Proteómica" de la Universidad Complutense de Madrid financiada por Merck Sharp & Dohme, desde Noviembre de 2011 hasta Julio de 2012.
- Contrato de personal investigador con cargo al proyecto BIO2009-07654, desde Septiembre de 2012 hasta Diciembre de 2012.



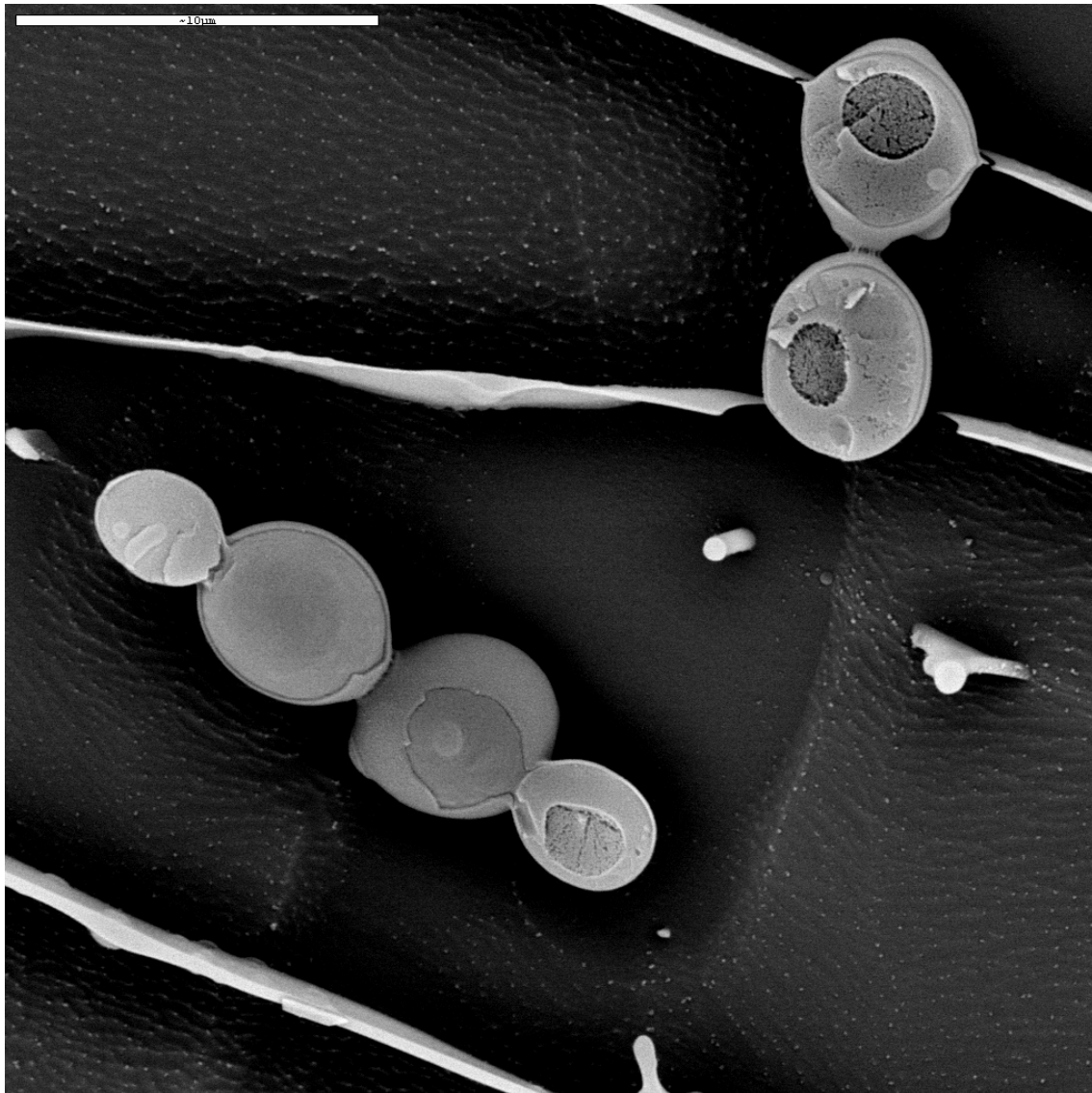
ÍNDICE

ABREVIATURAS	- 1 -
SUMMARY	- 7 -
1. Introduction.	- 9 -
2. Aims.	- 9 -
3. Results and discussion.	- 10 -
4. Conclusions.	- 12 -
INTRODUCCIÓN	- 15 -
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : Uso en la industria alimentaria y posibles efectos indeseables.	- 17 -
1.1. <i>S. cerevisiae</i> como suplemento dietético, prebiótico y alimento funcional.	- 18 -
1.2. <i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> como agente probiótico.	- 20 -
2. Infecciones fúngicas oportunistas.	- 22 -
2.1. Aspectos generales de las infecciones fúngicas oportunistas.	- 22 -
2.2. Factores de virulencia en patógenos fúngicos oportunistas.	- 23 -
2.3. Respuesta hongo-hospedador.	- 25 -
2.3.1. Inmunidad innata.	- 25 -
2.3.2. Inmunidad adquirida.	- 30 -
2.3.3. Respuesta del hongo.	- 31 -
3. <i>S. cerevisiae</i> como patógeno oportunista.	- 32 -
3.1. Epidemiología de <i>S. cerevisiae</i> .	- 32 -
3.2. Orígenes de infección y vías de entrada de <i>S. cerevisiae</i> .	- 33 -
3.3. Tipos de infecciones por <i>S. cerevisiae</i> .	- 35 -
3.4. Rasgos fenotípicos asociados a la virulencia en <i>S. cerevisiae</i> .	- 36 -
3.4.1. Crecimiento a altas temperaturas.	- 36 -
3.4.2. Pseudofilamentación.	- 37 -
3.4.3. Integridad de la pared celular.	- 41 -
3.4.4. Variación fenotípica o <i>switching</i> .	- 42 -
3.4.5. Secreción de hidrolasas extracelulares.	- 43 -
3.4.6. Tolerancia a estrés oxidativo.	- 43 -
3.4.7. Adhesión.	- 44 -
4. La pared celular de <i>S. cerevisiae</i> .	- 45 -
5. Proteómica.	- 47 -
5.1. Análisis proteómico de expresión diferencial 2D-DIGE.	- 51 -
5.2. Inmunoproteómica.	- 52 -

5.3. Análisis de subproteomas.	- 53 -
ANTECEDENTES	- 55 -
OBJETIVOS	- 59 -
MATERIALES Y MÉTODOS	- 63 -
1. Cepas microbianas.	- 65 -
2. Medios y condiciones de cultivo.	- 65 -
3. Determinación del crecimiento.	- 66 -
3.1. Turbidimetría.	- 66 -
3.2. Recuento de células.	- 67 -
3.3. Crecimiento en placa.	- 67 -
3.4. Determinación del tiempo de generación.	- 67 -
4. Valoración de la pérdida de permeabilidad selectiva mediante yoduro de propidio.	- 68 -
5. Adhesión celular a plásticos.	- 68 -
5.1. Adhesión a placa Petri.	- 68 -
5.2. Adhesión a placa multipocillo.	- 69 -
5.3. Adhesión a catéteres.	- 69 -
6. Variación fenotípica o <i>switching</i> colonial.	- 71 -
7. Interacción de <i>S. cerevisiae</i> con sangre.	- 71 -
7.1. Supervivencia en sangre.	- 72 -
7.2. Obtención de células de <i>S. cerevisiae</i> tras su incubación con sangre.	- 72 -
8. Incubación de células de <i>S. cerevisiae</i> con suero.	- 73 -
9. Microscopia.	- 73 -
10. Obtención de extractos proteicos de <i>S. cerevisiae</i> .	- 73 -
11. Precipitación de proteínas.	- 74 -
11.1. Precipitación con TCA-Acetona.	- 74 -
11.2. Precipitación con kit comercial 2D Clean-Up.	- 75 -
12. Cuantificación de proteínas.	- 75 -
12.1. Método espectrofotométrico.	- 75 -
12.2. Método Bradford.	- 75 -
12.3. Método RC DC de Bio-Rad.	- 75 -
13. Electroforesis.	- 76 -
14. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.	- 77 -

14.1. Tinción con Azul de Coomassie coloidal.	- 77 -
14.2. Tinción de plata.	- 77 -
15. Transferencia.	- 78 -
16. Detección de proteínas mediante <i>Western blotting</i> .	- 78 -
17. 2D-DIGE.	- 79 -
17.1. Preparación de las muestras.	- 79 -
17.2. Marcaje con fluorocromos.	- 80 -
17.3. Electroforesis bidimensional para el estudio de expresión diferencial 2D-DIGE.	- 80 -
17.4. Escaneado de los geles.	- 81 -
17.5. Análisis de imagen.	- 81 -
18. Obtención de péptidos de la superficie celular.	- 82 -
19. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.	- 83 -
19.1. MALDI-TOF/TOF.	- 83 -
19.2. LTQ (linear trap quadrupole).	- 84 -
20. Bases de datos y programas de anotación funcional.	- 85 -
RESULTADOS	- 87 -
1. Estudio comparativo de rasgos fenotípicos asociados a la virulencia en cepas de <i>S. cerevisiae</i> de origen comercial.	- 89 -
1.1. Estudio de crecimiento a diferentes temperaturas.	- 89 -
1.2. Análisis del fenómeno de <i>switching</i> colonial.	- 91 -
1.3. Activación de las rutas de MAPKs.	- 94 -
1.4. Estudio de morfología celular.	- 95 -
1.5. Estudio de adhesión a plástico.	- 95 -
1.5.1. Adhesión a poliestireno.	- 97 -
1.5.2. Adhesión a catéteres.	- 97 -
2. Análisis de la respuesta serológica a la infección sistémica por <i>S. cerevisiae</i> .	- 101 -
2.1. Infección de ratones.	- 101 -
2.2. Detección e identificación de proteínas inmunorreactivas de <i>S. cerevisiae</i> .	- 101 -
2.3. Inmunorreactividad de los sueros con proteínas de <i>C. albicans</i> .	- 108 -
3. Estudio de interacción con sangre de las cepas D14 y W303 de <i>S. cerevisiae</i> .	- 110 -
3.1. Estudio de supervivencia en sangre.	- 111 -
3.2. Análisis proteómico de expresión diferencial mediante 2D-DIGE.	- 112 -
3.2.1. Análisis proteómico diferencial entre las cepas D14 y W303 de <i>S. cerevisiae</i> a iguales tiempos de interacción con sangre.	- 114 -

3.2.2. Análisis proteómico diferencial de las cepas D14 y W303 de <i>S. cerevisiae</i> a lo largo de su interacción con sangre.	- 117 -
3.3. Resistencia a diferentes tipos de estreses.	- 130 -
4. Análisis del surfoma de la cepa D14 de <i>S. cerevisiae</i> tras su incubación con suero humano.	- 136 -
DISCUSIÓN	- 143 -
1. Virulencia de cepas comerciales de <i>S. cerevisiae</i> .	- 145 -
2. Proteínas con posible relación con la virulencia de <i>S. cerevisiae</i> .	- 153 -
3. Potenciales marcadores de infección por <i>S. cerevisiae</i> .	- 158 -
4. Proteínas de la superficie celular de <i>S. cerevisiae</i> : el surfoma.	- 163 -
5. Adhesión de proteínas de sangre y suero humanos a la superficie de <i>S. cerevisiae</i> .	- 168 -
CONCLUSIONES	- 171 -
BIBLIOGRAFÍA	- 175 -
ANEXOS	- 195 -
Anexo I.	- 197 -
Anexo II.	- 209 -
Anexo III.	- 219 -
Anexo IV.	- 225 -
Anexo V.	- 231 -
Anexo VI.	- 240 -



ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ALS (*Agglutinin-Like Adhesin*): Adhesina similar a aglutinina.

AMP: Adenosín monofosfato.

AMPK: Proteína kinasa activada por AMP.

BSA: Seroalbúmina bovina.

BVA (*Biological Variation Analysis*): Análisis de variaciones biológicas.

cAMP-PKA: Adenosin monofosfato cíclico-Proteína kinasa A.

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.

CGD (*Candida Genome Database*).

CHAPS: 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato.

CHCA: ácido α -ciano-4-hidroxicinámico.

CIB: Centro de Investigaciones Biológicas.

CID (*Collision-Induced Dissociation*): Disociación inducida por colisión.

CLRs: Receptores de lectina tipo C.

DC (*Dendritic Cell*): Célula dendrítica.

DIA (*Differential In gel Analysis*): Análisis diferencial en gel.

DTE: Ditioeritrol.

DTT: Ditiotreitrol.

EDA (*Extended Data Analysis*): Análisis extendido de datos.

EDTA: Ácido etilén diamino tetracético.

EPA (*EPithelial Adhesin*): Adhesina epitelial.

ESI (*Electro Spray Ionization*): Ionización con electro-spray.

EUROSCARF (*EUROpean Saccharomyces cerevisiae ARchive for Functional analysis*).

FDA (*Food and Drug Administration*).

FDR (*False Discovery Rate*): Ratio de falsos positivos.

GMP (*Good Manufacturing Practice*): Buenas prácticas de fabricación.

GO (*Gene Ontology*).

GPI (*Glycosylphosphatidylinositol*): Glicosilfosfatidilinositol.

GRAS (*Generally Regarded As Safe*): Considerados generalmente como seguros.

GTP: Guanosín trifosfato.

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*): cromatografía líquida de alta resolución.

IL: Interleucina.

IFN: Interferón.

IP: Ioduro de propidio.

IPG (*Immobilized pH Gradient*): Gradiente de pH inmovilizado.

iTRAQ (*Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*): Marcaje de isótopos para cuantificación relativa y absoluta.

LTQ (*Linear Trap Quadrupol*): Trampa iónica lineal.

MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*): Desorción/ionización asistida por láser sobre matriz-Tiempo de vuelo.

MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*): Proteína Kinasa activadas por mitógenos.

MAPKK: Proteín kinasa de una MAPK.

MAPKKK: Proteín kinasa de una MAPKK.

MBL (*circulating Mannose-Binding Lectin*): Lectina de unión a manosa.

MIPS (*Munich Information centre for Protein Sequences*).

MR (*Mannose Receptor*): Receptor de manosa.

MS (*Mass Spectrometry*): Espectrometría de masas.

m/z: masa/carga.

PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*): Patrones moleculares asociados a patógenos.

PBS (*Phosphate Buffered Saline*): Tampón fosfato salino.

PCR (*Polymerase Chain Reaction*): Reacción en cadena de la polimerasa.

pI: Punto isoeléctrico.

PIR (*Protein with Internal Repeats*): Proteína con repeticiones internas.

PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*): Huella peptídica.

PMSF: Fluoruro de metil fenil sulfonato.

PRR (*Pattern Recognition Receptors*): Receptores de reconocimiento de patrones.

Receptores NOD-like (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain receptors*): Receptores de dominio de oligomerización de unión a nucleótidos.

ROS (*Reactive Oxygen Species*): Especies reactivas de oxígeno.

SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*): dodecil sulfato sódico.

SGD (*Saccharomyces Genome Database*).

SERPA (*SERological Proteome Analysis*): Análisis del proteoma serológico.

SIDA: Síndrome de InmunoDeficiencia Adquirida.

SILAC (*Stable Isotope Label Amino acids Culture*): Marcaje con isótopos estables de aminoácidos del cultivo.

TCA: Ácido tricloroacético.

TFA: Ácido trifluoroacético.

TLCK (*Tosyl Lysine Chloromethyl Ketone*): Tosil lisín clorometil cetona.

TLR (*Toll-Like Receptor*): Receptor de tipo "Toll"

TPCK (*Tosyl PhenylAlanine Chloromethyl Ketone*): Tosil fenil alanín clorometil cetona.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

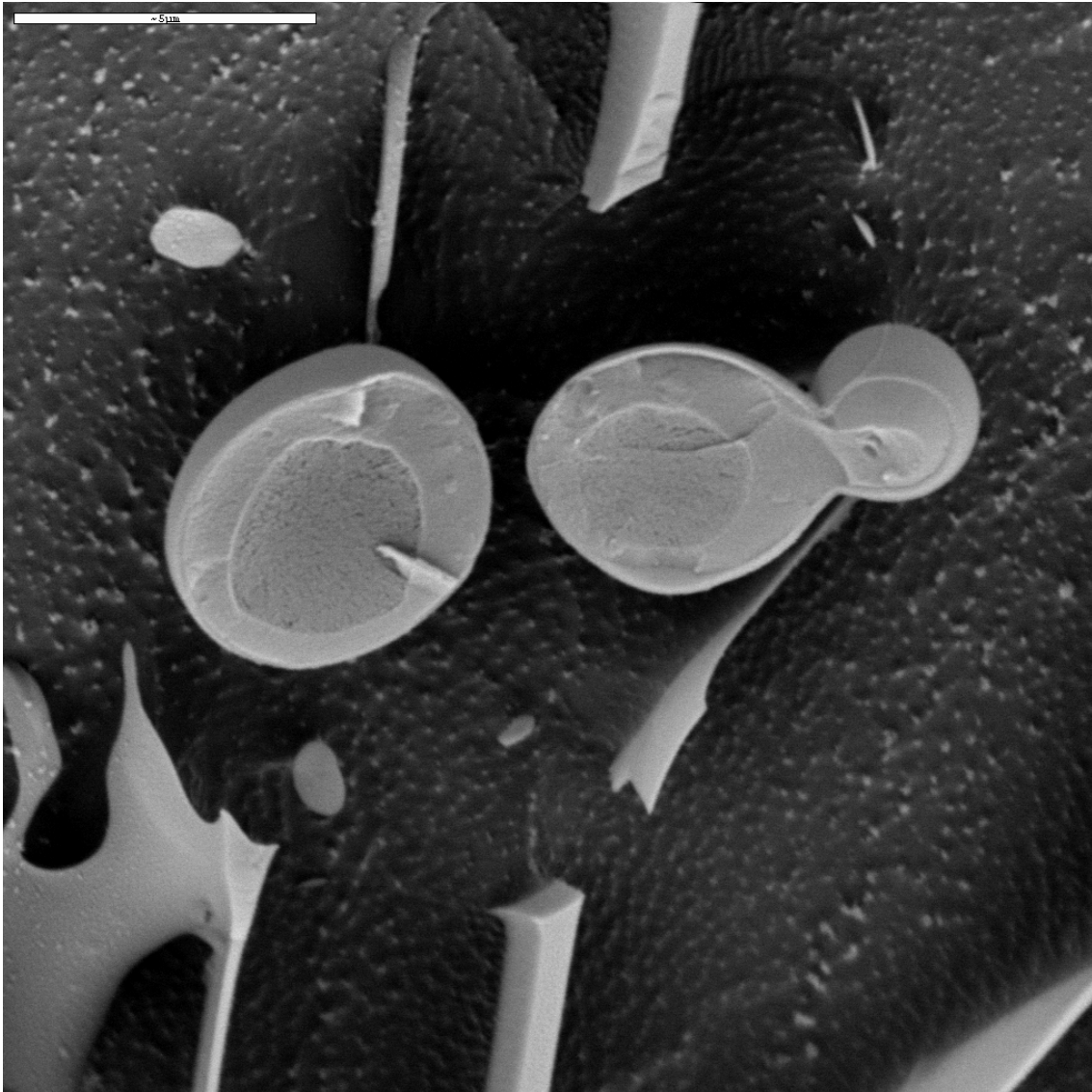
var.: variedad.

YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*): Extracto de levadura/peptona/dextrosa.

1D-PAGE (*1D-PolyAcrilamide Gel Electrophoresis*): Electroforesis monodimensional en gel de poliacrilamida.

2D-DIGE (*2D Difference In-Gel Electrophoresis*): Electroforesis bidimensional diferencial con fluorocromos.

2D-PAGE (*2D-PolyAcrilamide Gel Electrophoresis*): Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida.



SUMMARY

1. Introduction.

The yeast *S. cerevisiae* is well-known for its role in the elaboration of alcoholic beverages and bread. *Saccharomyces cerevisiae* has always been considered as a safe microorganism for nutritional use and the beneficial effects for the host derived from its consumption are recognized. Nevertheless, in recent years, clinical bibliography shows an increase in the number of described cases of infections by *S. cerevisiae* in humans (Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005), mainly in immunosuppressed patients. Thus, at the moment, *S. cerevisiae* is considered among emergent opportunistic pathogens (Muñoz y col., 2005; Murphy y Kavanagh, 1999). To investigate the possible relationship between the ingestion of living *S. cerevisiae* cells, through the consumption of dietary supplements, and infections in humans, different strains of *S. cerevisiae* from dietary supplements were isolated and their pathogenicity in living systems were studied by the group led by Dr. Amparo Querol and Dr. Teresa Fernández-Espinar at the IATA (Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos). Among these strains, the D14 strain showed to be virulent in a murine model of both systemic and oral infection (Llopis y col. 2013, submitted). In the present work, we study by means of classical microbiological techniques and proteomics tools the differences between virulent and avirulent strains of *S. cerevisiae* and its relationship with the host.

2. Aims.

The main objectives of this study were:

1. The study of different virulence associated traits, growth at different temperatures, colonial switching, MAPK pathways activation, and plastic adherence of *S. cerevisiae* strains D2, D4, D5, D6, D14 and D23 isolated from dietetic supplements and probiotics.
2. The immunoproteomic analysis of the serum response to the systemic infection by the virulent *S. cerevisiae* D14 (isolate from dietetic supplements) and the laboratory avirulent W303 strains in a murine model.
3. The 2D-DIGE differential expression proteomic analysis of *S. cerevisiae* D14 and W303 strains during incubation with human blood.
4. The proteomic analysis of the surface proteins (surfome) of *S. cerevisiae* D14 strain in the presence of human serum.

3. Results and discussion.

Virulence of commercial *S. cerevisiae* strains.

We have studied different putative virulence-related traits in several commercial *S. cerevisiae* strains. Among them, D2, D5, D14 strains and the clinical isolate 102 were able to grow at 39 and 42°C and showed a low generation time at 30 and 37°C as compared with the other strains assayed. Furthermore, these strains exhibited highest resistance to oxidative stress caused by H₂O₂. The virulent strains (D5, D14 and 102) also showed high resistance to osmotic stress (2M Sorbitol and 1,5M CLK). The avirulent hybrid strains, D6 (*S. cerevisiae*-*S. kudriavzevii*) and D23 (*S. cerevisiae*-*S. bayanus*), were not able to grow at 37°C (body temperature) and were more susceptible to oxidative and osmotic stress. All of the commercial strains tested displayed a similar colonial switching phenomenon; however, they presented different adhesion degrees depending on the plastic nature. D5, D6 and D14 strains had a constitutive activation of the MAPK of CWI (Cell Wall Integrity) pathway Slt2, and D5 strain also showed higher phosphorylation of Kss1, the MAPK of the pseudofilamentation pathway. Therefore, the greatest association to virulence was obtained in the case of growth at high temperatures and resistance to oxidative stress. These features, along with the pseudofilamentation ability have been also previously associated to the virulence of this yeast (Clemons y col., 1994; McCusker y col., 1994b; de Llanos y col, 2006; Diezmann y Dietrich, 2009). Therefore, they could be used as possible criteria to select putative avirulent strains, as a preventive control for safety in industrial processes. In contrast, colonial switching and adhesion to plastic materials could not be associated to virulence in the strains analyzed, whereas the constitutive activation of the MAPK of CWI observed in some virulent strains could reflect alteration of their cell wall that may be related with the recognition by the immune system and their virulence.

Proteomic analysis by 2D-DIGE.

We have performed a 2D-DIGE proteomic analysis to detect differential abundance of proteins between a virulent (D14) and an avirulent (W303) strains of *S. cerevisiae* during incubation with human blood. In agreement with the results obtained in the phenotypic assays, comparison of strains at time 0 revealed proteins with different abundance related with heat-shock response, pseudofilamentation and invasive growth, as well as resistance to the oxidative and osmotic stress. After incubation with blood, several proteins increase their abundance in the virulent D14 strains. For instance, Pst2, related with oxidative stress resistance, and Cit1, involved in glioxilate cycle, had been described to

augment as a consequence of the macrophage response to the fungal pathogen *Candida albicans* (Cabezón, 2009). We also identified human proteins that increased their abundance over time in the presence of blood, like those of the complement system (C3, Complement factor B and properdine). This result suggests that the alternative pathway of the complement is activated under these conditions.

Analysis of the serologic response to systemic *Saccharomyces* infection in murine model.

We also performed an immunoproteomic analysis with sera obtained from infected mice with the virulent and avirulent strains. Serum from not infected mice was used as control. In the analysis of the pattern of *S. cerevisiae* immunogenic proteins, large differences were observed depending on the *S. cerevisiae* strain inoculated in mice. D14 strain provoked a greater serological response than W303. In total, 37 immunogenic protein were identified, 32 with sera obtained from mice infected with D14 strain (virulent) versus 12 with W303 strain (avirulent). Furthermore, protein immunoreactivity was generally higher in D14 strain. Additionally, cross-reaction of *C. albicans* proteins against sera from mice infected with *S. cerevisiae* was detected. When the patterns of immunogenic proteins were compared with those obtained in *C. albicans* in previous immunoproteomic analysis (Pitarch y col., 1999; Pitarch y col., 2001; Pitarch y col., 2004; Fernández-Arenas y col., 2004; Pitarch y col., 2006; Pitarch y col., 2008; Martínez-López y col., 2008; Pitarch y col., 2011), we found that the immune response triggered by the virulent D14 strain showed greater similarities to that of *C. albicans* than to the one of the avirulent W303 strain. However, several proteins were only found to be immunogenic in *S. cerevisiae*. These results lead us to propose such proteins (Ssz1, Yhb1, Oye2, Gln1 and Kes1) as specific markers of infection by this yeast.

Proteomic analysis of proteins of the *S. cerevisiae* cell surface: Surfome.

In our surfome analysis, performed by digesting proteins on the surface of living yeast cells with trypsin, 202 proteins from *S. cerevisiae* D14 strain were identified, 150 of them were not found in previous surfome analyses of this yeast species (Insenser y col., 2010; Braconi y col., 2011). This increment in the number of identified proteins is likely a consequence of the high sensitivity of the Mass Spectrometer (LTQ Orbitrap) used in our analysis. Comparison of the surfomes of *S. cerevisiae* and *C. albicans* yielded 59 novel proteins detected in the cell surface of *S. cerevisiae* not found in *C. albicans*. The majority of the identified proteins are related to cell wall organization, metabolism, synthesis of proteins, and response to

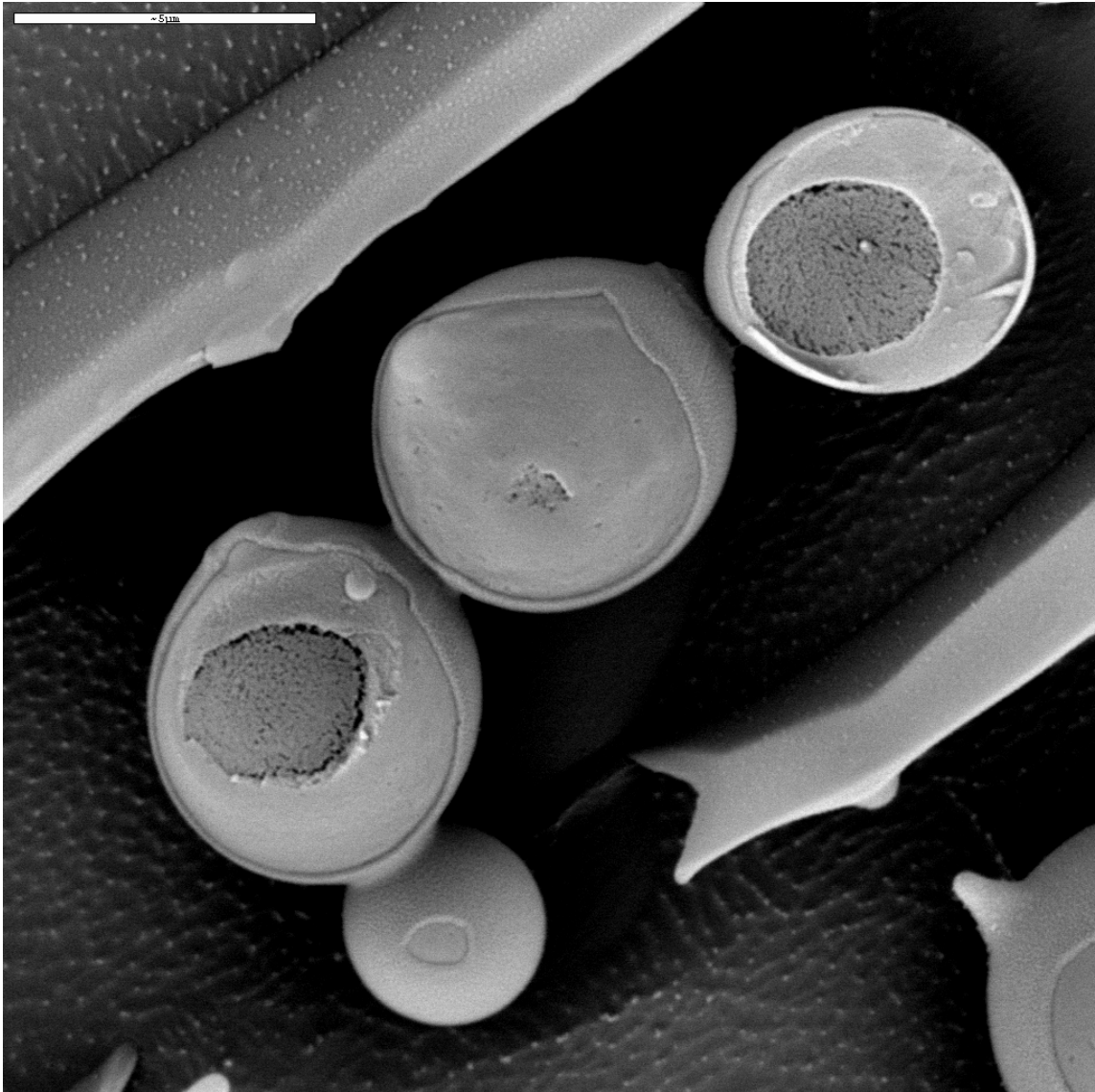
stress. Proteases and phospholipases were also found in the surfome. The presence of such hydrolytic enzymes on the cell surface might be related to the virulence of the strain. 74 proteins from the human serum have been also identified as bound to the cell surface of *S. cerevisiae* in this analysis. Most of them are proteins involved in the immune response, including proteins of the complement system and immunoglobulins, as well as in the coagulation process.

4. Conclusions.

Our results led us to propose the following conclusions:

1. Growth at high temperatures (39 and 42° C) and resistance to oxidative stress are the phenotypic features showing the largest relationship with the virulence in a murine model of *S. cerevisiae* strains isolated from dietetic supplements, enriched foods and probiotics.
2. No relationship was found between the colonial switching and the virulence of the strains studied. No direct relationship between the plastic adhesion capacity and the virulence was either found, since the distinct strains showed different adhesion degrees depending on the plastic nature. The clinical isolate 102 was the only strain displaying high adhesion to every plastic used.
3. The strains D5, D6 y D14 presented a constitutive activation of the MAPK Slt2. This reflects possible alterations in the composition of the cell wall. The strain D5, isolated from the Ultralevura® preparation, was the only one that presented basal activation of MAPK Kss1, which is consistent with its lengthened morphology.
4. Comparison of proteomes of the virulent strain D14 and the laboratory avirulent strain W303 during their interaction with blood by 2D-DIGE allowed us to detect changes in the abundance of proteins involved in heat shock response, pseudofilamentation and invasive growth, and oxidative and osmotic stress resistance.
5. The virulent strain D14 showed a higher survival rate than W303, after their incubation in blood during 1.5h.
6. The strain D14 provoked a greater serum response than W303 in the murine model and shared more number of immunogenic proteins with *C. albicans* than with the W303 strain.
7. 37 proteins have been identified as immunogenic against sera of mice infected with *S. cerevisiae*. 26 of them had not been previously described as immunogenic proteins in this yeast. 25 of these proteins were also detected in the surfome of D14 strain.
8. In the analysis of *S. cerevisiae* D14 surfome in the presence of human serum

202 proteins of *S. cerevisiae* were identified, 150 of them not detected in previous surfome analyses of this yeast. Besides, 74 proteins of human serum have been found as bound to the *S. cerevisiae* cell surface, most of them involved in the immune response.



INTRODUCCIÓN

1. *Saccharomyces cerevisiae*: Uso en la industria alimentaria y posibles efectos indeseables.

Existe una gran variedad de microorganismos que participan en la producción de bebidas y alimentos fermentados, destacando por su importancia las bacterias lácticas y las levaduras. Las levaduras han sido ampliamente utilizadas por el hombre a lo largo de la historia ya que tienen cualidades fermentadoras útiles para la preparación de alimentos y de bebidas alcohólicas. El proceso de fermentación de las levaduras, por el cual el azúcar se transforma en etanol y dióxido de carbono, fue descrito por primera vez en 1860 (Pasteur, 1860) y, aunque en la antigüedad no se tenía conocimiento de este proceso bioquímico, la fermentación ha sido utilizada desde hace miles de años como una manera efectiva para preparar bebidas y alimentos. Las primeras evidencias de una bebida fermentada se remontan al neolítico en China en el 7000 a.C. (McGovern y col., 2004) y a Mesopotamia en el 5400-5000 a.C. (McGovern y col., 1996), usándose en Asia principalmente el arroz para su producción, y en el antiguo Egipto y Mesopotamia las frutas para producir vino y los cereales malteados para la obtención de la cerveza. El pan realizado con levadura data de la misma época en el antiguo Egipto (Samuel, 1996).

Dentro de las levaduras de mayor importancia en la industria alimentaria está el género *Saccharomyces*, principalmente las especies *S. cerevisiae*, *S. bayanus* y *S. pastorianus*. Por su uso alimentario *S. cerevisiae* siempre se ha considerado como un microorganismo seguro. De hecho, es una levadura incluida en el estatus de microorganismos GRAS (*Generally Regarded As Safe*) por la FDA (*Food and Drug Administration*, USA), lo que permite su uso tanto en la industria agroalimentaria como en el campo biotecnológico.

Actualmente existe un gran interés por esta levadura en la industria agroalimentaria, ya que se utiliza en la elaboración de bebidas alcohólicas como el vino, la cerveza, el sake o la sidra y de alimentos como el pan o algunos tipos de quesos; además, esta levadura también es usada para producir ingredientes y aditivos alimentarios como la vanilina o el coenzima A (Fleet, 2006a), así como suplementos dietéticos y probióticos. Así mismo, hay que destacar que *S. cerevisiae* es considerado como el organismo eucariótico modelo por excelencia tanto en investigación como en biotecnología; de hecho es uno de los organismos más estudiados y mejor caracterizados, siendo el primer organismo eucariótico del que se conoció la secuencia completa de su genoma (Goffeau y col., 1996). Este amplio conocimiento, así como la facilidad para su cultivo y manipulación genética, han hecho que esta levadura sea muy utilizada en biotecnología. Un ejemplo de uso

industrial no alimentario de esta levadura es la producción de interferón y de proteínas antigénicas para la vacuna de la hepatitis B (Murphy y Kavanagh, 1999).

Sin embargo, a parte del papel positivo que tiene *S. cerevisiae* en la industria alimentaria y biotecnológica, esta levadura también puede ser un alterante de ciertos productos alimenticios. De entre las 120 especies de levaduras que Barnett y col. (1983) enumeraron como asociadas a los alimentos, *S. cerevisiae* es una de las 10 principales que Pitt y Hocking (1985) consideraron como responsables de la descomposición de los alimentos procesados y empaquetados de acuerdo a los estándares normales de buenas prácticas de fabricación (GMP). Las levaduras pueden producir deterioro en alimentos como frutas y zumos, productos de confitería, bebidas alcohólicas, bebidas gaseosas, ensaladas de vegetales con aderezos, productos lácteos fermentados, productos curados (salados) y productos cárnicos, así como otros alimentos con alto contenido en ácido y bajo pH, con alto nivel de azúcar (más del 10%) o de sal (más del 5% de NaCl). Además también pueden producir deterioro en alimentos a los que se les ha aplicado diferentes métodos de conservación como son la adición de inhibidores del crecimiento bacteriano o de ácidos orgánicos débiles (Fleet, 2006a).

Otro posible efecto indeseable de la levadura *S. cerevisiae* es su emergencia como patógeno oportunista de baja virulencia, aunque a este respecto existen pocos estudios, sin duda debido a que se ha considerado siempre un microorganismo seguro para uso alimentario. Sin embargo, en los últimos años, la bibliografía clínica muestra un aumento en el número de casos descritos de infecciones causadas por *S. cerevisiae* en humanos, principalmente en pacientes inmunodeprimidos, por lo que habría que reconsiderar la seguridad de este microorganismo (Hazen, 1995; Murphy y Kavanagh, 1999; Pontón y col., 2000; Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005; Miceli y col., 2011).

1.1. *S. cerevisiae* como suplemento dietético, prebiótico y alimento funcional.

Se entienden como suplementos dietéticos a aquellos que contienen un "ingrediente alimenticio" destinado a complementar la alimentación y cuyo consumo es por vía oral (definición de la FDA). La industria alimentaria produce suplementos dietéticos con un elevado valor alimenticio a partir de células vivas y extractos de la levadura *S. cerevisiae*. Estos suplementos dietéticos los podemos encontrar distribuidos en tiendas y farmacias como preparados comerciales en forma líquida, de cápsulas, de comprimidos y de copos. También podemos encontrar cervezas enriquecidas con esta levadura para mejorar su perfil

nutricional.

Es importante destacar que la levadura tiene también la propiedad de ser un prebiótico. Se consideran prebióticos los ingredientes que permiten cambios específicos de la microbiota gastrointestinal, tanto en la composición como en la actividad, que otorgan beneficios de bienestar y salud (de Vrese y Schrezenmeir, 2008). Se ha descrito que la ingesta de levadura inactiva (o de sus paredes celulares purificadas) favorece la instalación en el intestino de bacterias lácticas e impide su colonización por la *Salmonella typhimurium*. Estudios en modelo animal han indicado que la administración de las paredes celulares de levadura de cerveza en ratas con estreñimiento produce efectos prebióticos, tanto en cuanto a la mejora de la defecación como a la mejora de la microbiota fecal (Nakamura y col., 2001a; Nakamura y col., 2001b), y en un estudio *in vitro* también se ha mostrado que las paredes de esta levadura tienen un impacto significativo sobre la microbiota intestinal y sus metabolitos (Nakashimada y col., 2011). Además, varios estudios han sugerido que la administración diaria de paredes de esta levadura también puede reducir el colesterol (Hitomi y col., 2002b; Nakamura y col., 2002), mejorar la hiperlipidemia (Hitomi y col., 2002a), y aumentar la actividad anti-oxidante (Jaehrig y col., 2007).

Dado que los alimentos funcionales son aquellos en los que, con independencia de aportar nutrientes, se ha demostrado científicamente que afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporcionan un mejor estado de salud y bienestar, *S. cerevisiae* también se puede considerar un ingrediente de los alimentos funcionales. Estos alimentos, además, ejercen un papel preventivo ya que reducen los factores de riesgo que provocan la aparición de enfermedades. El interés de *S. cerevisiae* como ingrediente funcional es debido principalmente a las siguientes propiedades:

- Proteínas de alta calidad: sus proteínas son de valor biológico medio con una buena composición de aminoácidos y son el elemento nutricional más importante del suplemento dietético. Tienen un alto contenido en lisina y abundante isoleucina y treonina. Por ello, los suplementos dietéticos de levadura de cerveza son muy útiles para las dietas hipocalóricas deficitarias en proteínas ya que suplementan este déficit (Moyad, 2007; Moyad, 2008).
- Abundancia del complejo vitamínico B: ayuda a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y de osteoporosis.
- Minerales y oligoelementos: ayudan a reducir el riesgo de osteoporosis y a fortalecer el sistema inmune.
- Lípidos: los ácidos oleico y linoleico ayudan a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y a disminuir los síntomas de la menopausia.

- Elevada cantidad de fibra: La pared celular de la levadura, contiene principalmente fibra dietética insoluble en agua (β -glucano y α -manano) y proteínas unidas a ésta. A esta fibra se le atribuyen las propiedades prebióticas beneficiosas para la salud antes descritas.

1.2. *S. cerevisiae* var. *boulardii* como agente probiótico.

Los probióticos son microorganismos viables que son beneficiosos para el hospedador cuando se consumen en las cantidades apropiadas. Se entiende por beneficio la reducción en la duración de las diarreas, la estimulación del sistema inmune, la reducción de los niveles de colesterol, así como el aumento en la absorción de nutrientes (Marteau y Boutron-Ruault, 2002). Los principales agentes probióticos son las bacterias lácticas, pero existe un creciente interés por añadir otros microorganismos a este grupo. *S. cerevisiae* var. *boulardii* es el único agente probiótico no bacteriano conocido. Posee todas las propiedades descritas anteriormente para *S. cerevisiae* como ingrediente funcional, lo que junto a su capacidad para resistir la acción del ácido gástrico y de la bilis hacen a *S. cerevisiae* var. *boulardii* especialmente interesante como probiótico.

S. cerevisiae var. *boulardii* fue aislada de la fruta del lychee en 1920 en Indochina por Henri Boulard, quien descubrió sus propiedades probióticas durante un brote de cólera al ver que algunas personas que consumían té hecho con lychee no desarrollaban esta enfermedad. Esta levadura ha sido utilizada con éxito durante los últimos 20 años como agente probiótico para el tratamiento de pacientes con casos graves de diarrea y otros trastornos gastrointestinales (Fleet, 2006a), describiéndose por primera vez su uso como tal a principios de los años 50 (McFarland y Bernasconi, 1993; McFarland, 2010).

Este probiótico se comercializa actualmente en diferentes formatos: en forma de polvo liofilizado, de cápsulas o en bebidas, y tanto solo como en preparados donde se mezclan distintos probióticos. Es utilizado con fines bioterapéuticos para el tratamiento de distintos tipos de diarreas y desórdenes gastrointestinales: diarreas asociadas al uso de antibióticos, diarrea del viajero, enfermedad de Crohn y otros desórdenes inflamatorios intestinales, infecciones por *Helicobacter pylori*, gastroenteritis agudas en adultos y niños, diarreas crónicas en pacientes con SIDA y diarreas causadas por *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae* y varias enterobacterias (Czerucka y Rampal 2002; McFarland, 2010).

S. cerevisiae var. *boulardii* tiene diferentes posibles mecanismos de acción como probiótico (McFarland, 2010) (figura 1). Esta levadura puede interferir con

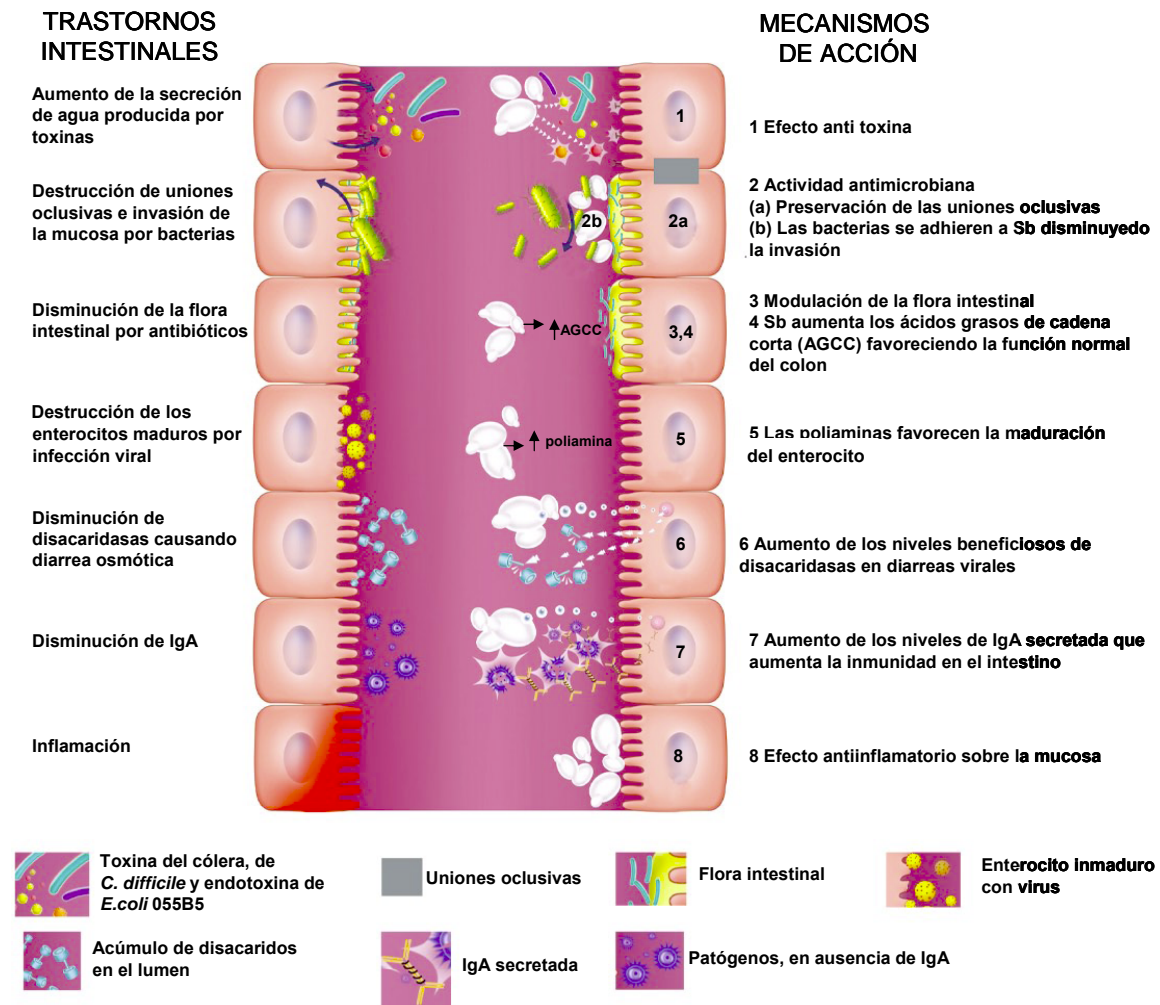


Figura 1. Posibles mecanismos de acción de la levadura *S. cerevisiae* var. *boulardii* (Sb) en el tracto intestinal. Modificada de McFarland (2010).

las toxinas liberadas por patógenos en la luz intestinal, como se ha visto en el caso de las toxinas A y B de *C. difficile* (Castagliuolo y col., 1996), la toxina del cólera (Vidon y col., 1986) y las endotoxinas de superficie de *Escherichia coli* 055B5 (Buts y col., 2006). También puede interferir en la colonización o invasión de las mucosas intestinales por patógenos como *Candida albicans*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Yersinia enterocolitica* (Ducluzeau y Bensaada, 1982; Zbinden y col., 1999). Además, puede interactuar con la microbiota normal o ayudar a su restablecimiento tras un tratamiento con antibióticos (McFarland, 2010). Otro mecanismo de acción de esta levadura es la restauración del balance de ácidos grasos de cadena corta disminuidos durante los desordenes intestinales, favoreciendo el funcionamiento normal del colon (McFarland, 2010). También puede ejercer efectos beneficiosos a través de las poliaminas que favorecen la maduración de los enterocitos y aumentando las disacaridasas a niveles beneficiosos en las diarreas virales (McFarland, 2010). Además puede actuar sobre el sistema inmune aumentando los niveles de IgA secretadas incrementando así las defensas, o

disminuyendo el nivel de citocinas regulando la inflamación (McFarland, 2010).

Sin embargo, *S. cerevisiae* var. *boulardii* también puede causar efectos negativos para la salud. Como se comenta en el siguiente apartado, existe bibliografía de casos clínicos que relacionan a esta levadura con casos de fungemia, lo cual hace que su uso como probiótico en hospitales actualmente sea un tema controvertido (Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005).

2. Infecciones fúngicas oportunistas.

2.1. Aspectos generales de las infecciones fúngicas oportunistas.

Las infecciones fúngicas oportunistas constituyen una importante causa de mortalidad y morbilidad entre los pacientes hospitalizados en todo el mundo. Estas infecciones están causadas por hongos tales como *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus* o *Cryptococcus neoformans* (Pontón y col., 2000), aunque existen otras especies de *Candida* que están emergiendo como patógenos oportunistas como son *C. parapsilosis*, *C. tropicales*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae* y *C. guilliermondii* (Aziz y col., 2012). Otras especies patógenas oportunistas fúngicas que raramente producen infecciones invasivas en pacientes inmunodeprimidos son *Pneumocystis*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Malassezia* y *S. cerevisiae* (Miceli y col., 2011; Aziz y col., 2012).

En las últimas dos décadas se ha producido un incremento en el número de casos de infecciones oportunistas. Esto es debido al aumento del número de pacientes inmunodeprimidos ya que son éstos los que principalmente sufren este tipo de infecciones. Este incremento de pacientes inmunodeprimidos es debido a enfermedades como el SIDA o el cáncer, y a avances médicos. Entre los últimos podemos citar el uso de nuevas terapias inmunosupresoras para tratar enfermedades autoinmunes o para aumentar el éxito de los trasplantes, el uso de quimioterapia para tratar el cáncer, o los tratamientos profilácticos con antibióticos de amplio espectro (Singh, 2001). El uso prolongado de antibióticos de amplio espectro puede derivar en la proliferación del crecimiento de levaduras en las superficies mucosas (Hazen, 1995); de hecho Badenhorst y col. (1991) señalaron dos factores de riesgo en el desarrollo de fungemia: la terapia con antimicrobianos de amplio espectro y los trastornos abdominales. Los agentes antineoplásicos pueden provocar el adelgazamiento de la barrera protectora de la mucosa del tracto gastrointestinal y la atenuación de la respuesta inmune celular (Hazen, 1995). Otros factores que también contribuyen a que se produzcan más infecciones

oportunistas son la hospitalización, las lesiones de la mucosa gastrointestinal, la neutropenia y la inserción de catéteres. En concreto la cateterización provoca una rotura de la integridad de la barrera cutánea pudiendo ser una vía de entrada.

La fungemia es posiblemente la manifestación más grave de las levaduras patógenas oportunistas pudiendo diseminarse a diferentes órganos como corazón, pulmones, hígado, riñón o cerebro. Otras manifestaciones clínicas de las levaduras oportunistas son las infecciones superficiales de la piel, áreas membranosas, cavidad oral, vagina y tracto respiratorio (Fleet y Roostita, 2006b).

El origen de infección por estas levaduras patógenas oportunistas es difícil de determinar ya que están de forma habitual en el ambiente e incluso pueden formar parte de la microbiota del hospedador como es el caso de *C. albicans* que puede aislarse del tracto gastrointestinal o de la vagina de personas sanas. También pueden provenir del personal sanitario, ya que un alto porcentaje de ellos porta levaduras en sus manos (Strausbaugh y col., 1994), o de alimentos o bebidas que contengan estos microorganismos y que mediante translocación a la sangre puedan causar infección. Otro foco de infección, que ya se ha comentado, sería el catéter intravenoso, sobre todo aquel que permanece colocado durante largos periodos, ya que algunas levaduras son capaces de crecer sobre su superficie formando biopelículas (Kojic y Darouiche, 2004).

2.2. Factores de virulencia en patógenos fúngicos oportunistas.

La virulencia fúngica oportunista es un proceso complejo en el que juegan un papel muy importante tanto las defensas del hospedador como la expresión de genes relacionados con la patogenicidad y con el proceso de infección por parte del microorganismo. La infección implica una compleja interacción entre el hongo y el hospedador. No existe un único factor de virulencia que lleve al patógeno oportunista a producir la infección, sino que son necesarios un conjunto de éstos, junto con el debilitamiento de las defensas del hospedador, (van Burik y Magee, 2001). La identificación de los factores de virulencia fúngica así como el reconocimiento de los mecanismos de patogénesis pueden llevarnos a encontrar nuevas y eficaces terapias antifúngicas. Existe una gran variabilidad de factores asociados a la patogenicidad de hongos oportunistas por lo que es muy difícil establecer los atributos de virulencia necesarios para una infección.

Algunos de estos factores asociados a la virulencia son:

- la capacidad de algunas especies, como *C. albicans*, *C. neoformans* o *A. fumigatus*, de liberar al medio extracelular enzimas hidrolíticas (Karkowska-

Kuleta y col., 2009) que desempeñan un papel importante en la nutrición y el daño a los tejidos.

- la adhesión a células y tejidos de *C. albicans* (Chaffin y col., 1998) y de *A. fumigatus* (Latge, 2001), que es esencial para la invasión e infección.
- la capacidad de *C. albicans* para formar biopelículas sobre sustratos artificiales (Chandra y col., 2001) como los catéteres.
- el crecimiento a 37°C y temperaturas superiores de *C. albicans*, *C. neoformans* y *A. fumigatus* (Tekaia y Latge, 2005; Karkowska-Kuleta y col., 2009), que les permite su supervivencia a la temperatura corporal del huésped.
- la alteración de su estructura o morfología para invadir tejidos, como es el caso de la formación de hifas en *C. albicans* y de cápsula en *C. neoformans* (Karkowska-Kuleta y col., 2009).
- el fenómeno de *switching* colonial en *C. albicans* (Odds, 1997) y en *C. neoformans* (Guerrero y Fries, 2008). Éste es un mecanismo de plasticidad fenotípica desarrollado para adaptarse rápidamente a las diferentes condiciones ambientales, y se manifiesta como un cambio en el aspecto colonial que es reversible, lo que es importante para la adaptación de la levadura en el proceso de infección, ya que algunas subpoblaciones pueden ser más virulentas y más eficaces durante este proceso.
- la capacidad de adquirir hierro durante la infección de *C. albicans* y de *C. neoformans* (Karkowska-Kuleta y col., 2009), crucial para sobrevivir durante la invasión en el torrente sanguíneo.
- la calcineurina en *C. albicans* (Blankenship y Heitman, 2005), *C. neoformans* y *A. fumigatus* (Steinbach y col., 2006), esencial para la supervivencia de hongos en el organismo.
- la producción de melanina, pigmento de la pared celular que proporciona protección contra la radiación ultravioleta, las temperaturas extremas y otras condiciones ambientales adversas, en *C. neoformans* (Perfect, 2006) y *A. fumigatus* (Rementeria y col., 2005).
- la producción de manitol por *C. neoformans* (Karkowska-Kuleta y col., 2009), que protege al hongo del daño oxidativo.
- la producción de enzimas que protegen del daño oxidativo (catalasa y superóxido dismutasa) en *C. albicans* (Brown y col., 2007) y en *A. fumigatus* (Latge, 2001).
- la secreción de diferentes tipos de toxinas al medio ambiente o durante la infección de *A. fumigatus* (Karkowska-Kuleta y col., 2009).

En general, son características que van a permitir al patógeno evadir las defensas del hospedador, invadir y colonizar los tejidos y finalmente causar daño.

2.3. Respuesta hongo-hospedador.

Para defenderse de los microorganismos patógenos y de los agentes extraños, el sistema inmunitario consta de dos "líneas de defensa" principales: la inmunidad innata, natural o inespecífica y la inmunidad adquirida, adaptativa o específica.

2.3.1. Inmunidad innata.

Tradicionalmente, la inmunidad innata se ha considerado simplemente como una primera línea de defensa. Sin embargo, ha recibido recientemente mayor atención debido a que, a pesar de una cierta falta de especificidad, es rápida y eficaz frente a la mayoría de las infecciones microbianas y activa los mecanismos de inmunidad adaptativa (Blanco y García, 2008).

Cuando los microorganismos consiguen atravesar la piel y los epitelios, actúan determinados mecanismos de la inmunidad inespecífica para la destrucción del patógeno. La inmunidad innata tiende a desarrollar un proceso inflamatorio en el lugar de la infección para conseguir reclutar elementos humorales y celulares de la inmunidad y eliminar así la infección. Los neutrófilos convergen en el tejido infectado y fagocitan y destruyen a los microorganismos empleando mecanismos citotóxicos, los macrófagos se extravasan a los tejidos donde fagocitan y destruyen a los microorganismos y producen una amplia diversidad de citocinas y quimiocinas que orientan el curso de la reacción inflamatoria local, y las células NK tienen como función destruir células infectadas y células neoplásicas y liberar citocinas inflamatorias. Los diferentes tipos celulares que actúan en la inmunidad innata (leucocitos, células de la piel y epitelios o células parenquimatosas) presentan "receptores de reconocimiento de patrones" (denominados PRR por *Pattern Recognition Receptors*) que sirven para reconocer a los microorganismos, sus productos y las señales de daño celular que generan. Los PRRs reconocen los "patrones moleculares asociados a patógenos" (denominados PAMPs por *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) que son moléculas presentes en los microorganismos que no están presentes en el huésped, compartidas por diferentes microorganismos y esenciales para su supervivencia o patogenicidad. Gracias a este reconocimiento se produce una respuesta rápida dando lugar a la fagocitosis, la producción de sustancias con actividad microbiostática o microbicida y de mediadores pro-inflamatorios como las citocinas capaces de orientar el curso de la respuesta inmune (Seider y col., 2010).

Se han descrito varias clases de PRRs, entre ellos los receptores *Toll-like* (TLRs), los receptores de lectina tipo C (CLRs), los receptores *NOD-like* y las helicasas RigI. Los dos primeros tipos de receptores juegan un papel importante en la inmunidad

antifúngica (van de Veerdonk y col., 2008). Se ha documentado la participación de estos PRRs en la defensa frente a hongos patógenos como *C. albicans*, *A. fumigatus*, *C. neoformans* y *Pneumocystis spp* (Wang y col., 2001; Netea y col., 2002; Meier y col., 2003; Netea y col., 2006; Blanco y García, 2008). Los neutrófilos, monocitos y macrófagos representan la primera línea de defensa contra los patógenos fúngicos. Hay que destacar que existe cierta especialización en la inmunidad innata, ya que, en función del tipo de microorganismo, actúan unos tipos celulares y moléculas concretos. Por ejemplo, los macrófagos son las células principales implicadas en la infección por *Cryptococcus* y *Pneumocystis*, mientras que los neutrófilos son las células efectoras primarias en la prevención de la infección por *C. albicans* y *A. fumigatus* (Traynor y Huffnagle, 2001; Blanco y García, 2008). Las diferentes poblaciones celulares del sistema inmune presentan diferencias en la expresión de TLRs y CLRs en su membrana celular, siendo capaces de iniciar diferentes respuestas frente a los hongos. La pared celular de los hongos representa un objetivo ideal para el reconocimiento de lo ajeno por parte de estos receptores ya que no se encuentra presente en los mamíferos, actuando sus componentes (por ejemplo, β -glucano o quitina) como PAMPs. Existen muchas diferencias entre la pared celular de los distintos hongos patógenos, lo que se traduce en diferentes interacciones PRR-PAMP, que dan lugar a respuestas específicas para los diferentes hongos (van de Veerdonk y col., 2008).

La interacción de TLRs-PAMPs induce la activación de cascadas de MAP (*Mitogen Activated Protein*) Kinasas en células de mamíferos, y la translocación nuclear de factores de transcripción tales como NF- κ B, NF-AT y IRF3, que inducen la expresión génica de diversas quimiocinas y citocinas (Akira y col., 2006). Se ha descrito que TLR2 y TLR6 están implicados en el reconocimiento del zymosan (mezcla de polisacáridos derivados de la pared celular de *S. cerevisiae*, compuesto principalmente de glucano y manano) (Ozinsky y col., 2000). TLR4 parece jugar un papel antifúngico en las defensas del hospedador mediante el reconocimiento de mananos y la mediación de respuestas pro-inflamatorias; de hecho, en diversos estudios se ha visto el importante papel de TLR4 en las defensas frente a infección por hongos como *C. albicans*, *A. fumigatus* y *Pneumocystis* (Wang y col., 2001; Netea y col., 2002; Ding y col., 2005). Además, Tada y col. (2002) describieron en 2002 el reconocimiento de mananos de *S. cerevisiae* y *C. albicans* por parte de TLR4.

Los CLRs comprenden una gran familia de receptores, incluyendo dectina-1, el receptor de manosa de macrófagos (MR), DC-SIGN (*dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin*), dectina-2, galectina-3 y MBL (*circulating mannose-binding lectin*). Estos receptores comparten uno o más dominios de reconocimiento de

carbohidratos. La dectina-1 reconoce los β -(1,3)-glucanos activándose la fagocitosis y pudiéndose desencadenar la producción de citocinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias (Brown, 2006). Este receptor tiene un importante papel en la inmunidad antifúngica frente a hongos como *C. albicans* y *A. fumigatus* (Steele y col., 2005; Gow y col., 2007). Los MR están implicados en el reconocimiento de varios hongos, incluyendo *C. neoformans*, *C. albicans* y *Pneumocystis* (Kery y col., 1992; Zhang y col., 2004a; Pietrella y col., 2005). DC-SIGN reconoce estructuras con un alto contenido en manosa y son dependientes de calcio, en hongos patógenos como *C. albicans* y *A. fumigatus* (Cambi y col., 2003; Serrano-Gómez y col., 2004). La dectina-2 también reconoce estructuras con alto contenido en manosa, y parece jugar un papel principal en el reconocimiento de las hifas de los hongos como *C. albicans*, *Trichophyton rubrum* y *Microsporum audouinii*, así como en la producción de citocinas proinflamatorias (Sato y col., 2006). La galectina-3 es un receptor expresado principalmente por los macrófagos y se ha descrito en el reconocimiento de β -oligomanósidos de *C. albicans* en colaboración con TLR2 (Jouault y col., 2006). Los MBLs son receptores solubles secretados por el hígado, que pueden unirse a hongos como *C. albicans* y *A. fumigatus*, además de a las cicatrices de la cápsula de diferentes cepas de *Cryptococcus* (Neth y col., 2000). Están involucrados en la inmunidad debido principalmente a su capacidad para opsonizar y activar el sistema del complemento (Brouwer y col., 2008).

Algunos hongos patógenos han desarrollado estrategias para evitar la inmunidad innata, como evadir el reconocimiento al enmascarar las moléculas de la superficie que provocan la respuesta inmune o evitar la fagocitosis mediante barreras físicas o inhibiendo la opsonización (Seider y col., 2010). *C. albicans* evita en parte el reconocimiento de los β -glucanos de la pared celular por parte de la dectina-1 con una capa de manoproteínas que hace menos visibles los β -glucanos al hospedador (Klippel y col., 2010). Aunque otros PRR detecten las manoproteínas, esta forma de evasión del sistema inmune parece ser beneficiosa para *C. albicans*. Además, cuando pasa de levadura a hifa evita la exposición de los β -glucanos en las cicatrices de la gemación. Un mecanismo similar ocurre en *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis* donde una capa de α -(1,3)-glucano evita el reconocimiento del β -glucano (Chai y col., 2009). En *C. neoformans* la cápsula polisacáridica evita su reconocimiento (Zaragoza y col., 2009).

Una vez detectados por el sistema inmune, hay hongos capaces de bloquear la fagocitosis debido a su tamaño celular, siendo un medio eficaz de dificultar la ingestión. En el caso de *C. albicans*, las hifas no son internalizadas de manera eficiente, y en el caso de *C. neoformans* su gran cápsula es un elemento disuasivo para la fagocitosis (Collette y Lorenz, 2011).

Los hongos patógenos también pueden tener mecanismos que les permiten escapar tras ser fagocitados. Los fagocitos inician la fagocitosis del microorganismo y forman el fagosoma que tras madurar forma el fagolisosoma que tiene un microambiente para la eliminación del patógeno con pH bajo, enzimas hidrolíticas, defensinas, péptidos antimicrobianos, compuestos tóxicos oxidativos y limitación de nutrientes. Hay hongos capaces de desarrollar estrategias para sobrevivir a este proceso que van desde alterar la maduración del fagosoma hasta el escape del fagolisosoma o la adaptación a este microambiente. *H. capsulatum* puede sobrevivir a la fagocitosis e incluso replicarse dentro de los macrófagos (Woods, 2003). *C. albicans* es capaz de escapar del fagocito mediante la formación de hifas, puede manipular la maduración de los fagosomas y resistir a la destrucción por parte de los macrófagos, por ejemplo, contrarrestando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Tavanti y col., 2006). *C. neoformans* es capaz de permeabilizar la membrana del fagosoma y escapar (Collette y Lorenz, 2011).

Los hongos patógenos también pueden evadir la activación del sistema del complemento. Éste consta de más de treinta proteínas séricas que se encuentran en la sangre y en los líquidos extravasculares, las cuales son capaces de ser activadas por determinadas estructuras microbianas e interactúan entre sí y con otros elementos del sistema inmunitario. Normalmente el sistema del complemento se encuentran en forma inactiva y su forma de activación involucra un potente mecanismo de amplificación. Se produce una activación enzimática en cascada dando una respuesta rápida y amplificada del estímulo inicial, que provoca la lisis de los microorganismos, la fagocitosis, estimula la quimiotaxis y propicia la inflamación. Este sistema puede activarse por la vía clásica, por la vía alternativa y por la vía de las lectinas (figura 2). Las tres rutas comparten las últimas fases, consistentes en el ensamblaje, sobre la superficie del microorganismo, del denominado complejo de ataque a la membrana (formado por las proteínas C5b, C6, C7, C8 y C9), responsable de la actividad lítica del complemento. Además, la activación del complemento por cualquiera de sus vías, genera moléculas, como C3b, que actúan como opsoninas que facilitan la fagocitosis de los microorganismos recubiertos por ellas. Otras fracciones como C3a y C5a actúan como anafilotoxinas, mediando una reacción inflamatoria. La pared celular de los hongos puede hacerles resistentes a la lisis mediada por el complemento al formarse el poro, debido a la protección estérica de la capa de polisacáridos de la pared celular, lo que impide el anclaje del complejo enzimático a la membrana celular (Kozel y col., 1996; Shoham y Levitz, 2005; Zipfel y Skerka, 2009). Además, algunos hongos son capaces de producir proteínas que actúan sobre el sistema del complemento. Por ejemplo, las proteínas Pra1 y Gpm1 de *C. albicans* son capaces de unirse a reguladores del

sistema del complemento, como el Factor H y FHL-1, ayudando a evadir la deposición del complemento (Luo y col., 2009). *C. neoformans* secreta la proteína antifagocítica App1, que se une a receptores del complemento, inhibiendo la fagocitosis (Luberto y col., 2003). Además de la unión a inhibidores de la cascada del complemento, varios hongos patógenos son capaces de degradar directamente proteínas del complemento y proteínas de matriz extracelular. *C. albicans* secreta varias proteasas de la familia de las proteínas Sap que proteolizan proteínas del complemento como C3b, C4b, y C5 (Naglik y col., 2003), que son también degradadas por la proteasa Alp1 de *A. fumigatus* (Behnsen y col., 2010).

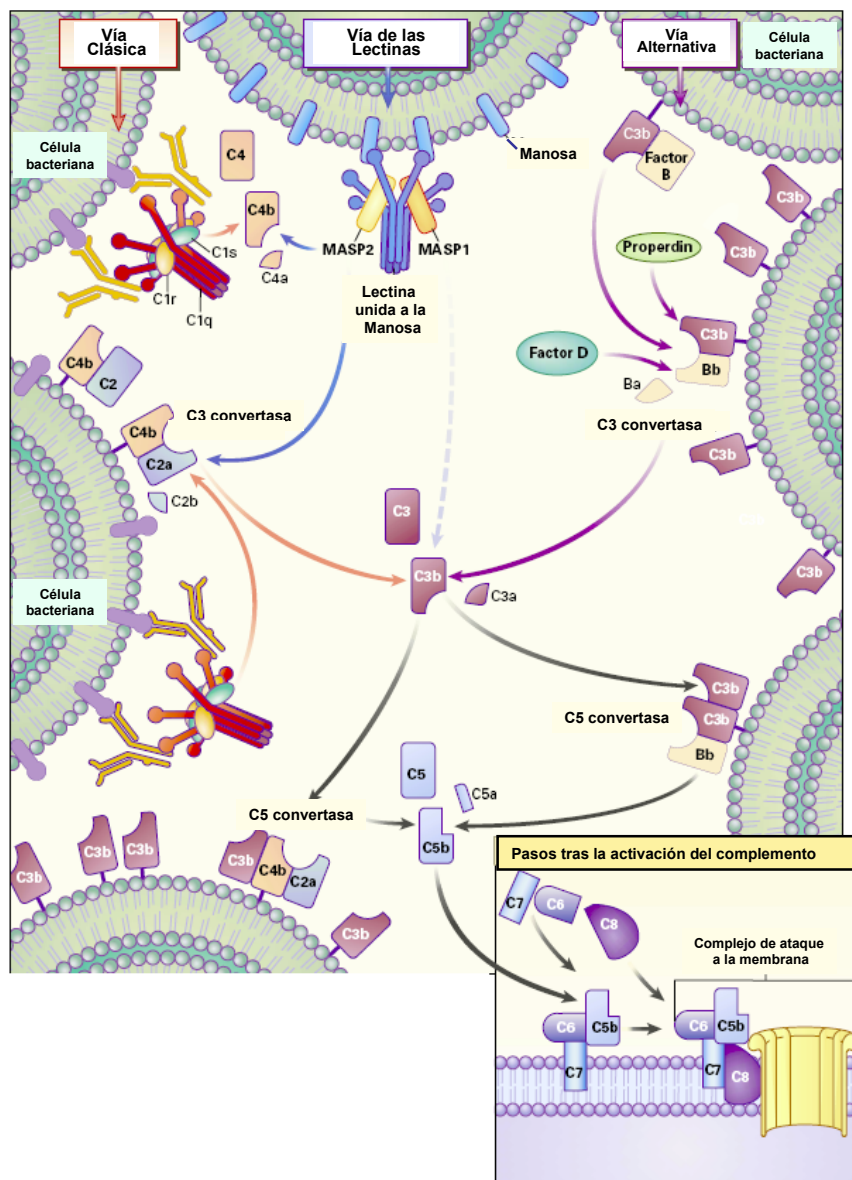


Figura 2. Vías de activación del sistema del complemento. Modificada de Walport (2001).

2.3.2. Inmunidad adquirida.

Los elementos celulares de la inmunidad adquirida son los linfocitos T y B, los cuales reconocen antígenos específicos a través de receptores. Los linfocitos B se diferencian a células secretoras de anticuerpos o plasmocitos y los linfocitos T se diferencian a células con diferentes perfiles fenotípicos y funcionales que incluyen el reclutamiento y activación de células fagocíticas para la eliminación de la infección.

Respecto a la inmunidad mediada por anticuerpos, la funcionalidad de éstos está ligada a su capacidad tanto para mediar el reconocimiento antigénico, bloqueando la penetración del patógeno a las células diana o también neutralizando la actividad de las toxinas, como para reclutar mecanismos efectores de distinta naturaleza, como la activación del complemento por la ruta clásica o la activación de respuestas celulares. En el caso de las infecciones fúngicas, existe controversia acerca de la importancia de la inmunidad mediada por anticuerpos y ésta puede ser diferente para cada patógeno fúngico. En el caso de *C. albicans* y *C. neoformans*, existen pruebas de que algunos anticuerpos pueden modificar el curso de la infección para el beneficio del huésped (Casadevall, 1995). En *C. albicans* se ha descrito que los anticuerpos frente a la proteína Hsp90 dan una respuesta protectora (Matthews y col., 1988; Matthews y col., 1991). Respecto a otros hongos patógenos, en *Pneumocystis carinii* ha sido descrito que la inmunidad mediada por anticuerpos puede ser importante para la defensa del huésped (Gigliotti y Hughes, 1988; Roths y Sidman, 1993; Harmsen y col., 1995) mientras que para los estudios de *A. fumigatus*, *H. capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* y *Coccidioides immitis* la importancia de la inmunidad mediada por anticuerpos no es concluyente (Casadevall, 1995). La dificultad para establecer el papel de este tipo de inmunidad en la mayoría de las infecciones por hongos sugiere que los hongos son resistentes o pueden escapar o neutralizar los efectos de los anticuerpos. De hecho, muchos hongos, incluidos *C. albicans* (Ruchel, 1986; Kaminishi y col., 1995) y *C. neoformans* (Brueske, 1986), producen proteasas que pueden degradar inmunoglobulinas.

La inducción de un tipo u otro de inmunidad mediada por células es crítica para la resistencia o susceptibilidad a la infección fúngica. Históricamente, se ha pensado que la protección frente a las infecciones fúngicas requiere la diferenciación de los linfocitos T a células Th1, mientras que la inmunidad Th2 da lugar generalmente a susceptibilidad a la infección o a las respuestas alérgicas (Traynor y Huffnagle, 2001; Romani, 2004). Las células Th1 producen predominantemente citocinas tales como Interleucina-2 (IL-2) e interferón-gamma (IFN- γ), y promueven la inmunidad mediada por células y la activación de los fagocitos, mientras que las células Th2 producen predominantemente las interleucinas 3 y 4 (IL-3 e IL-4) y tienden a

promover la producción de anticuerpos (Traynor y Huffnagle, 2001; Cramer y Blaser, 2002; Bellocchio y col., 2005; Blanco y García, 2008). Más recientemente, la respuesta Th17 ha sido descrita como protectora frente a hongos patógenos (Curtis y Way, 2009). Las células Th17 se caracterizan por la producción de IL-17, aunque además de la IL-17A e IL-17F, producen otra variedad de citocinas, tales como IL-21 y IL-22 y son capaces de inducir una variedad de respuestas inflamatorias y antimicrobianas en células mieloides y epiteliales (Korn y col., 2009). En modelo murino, se ha descrito que la respuesta Th17 confiere protección tanto sistémica como en mucosas frente a *C. albicans*, lo que se ha atribuido a los efectos de la IL-17 en la inducción de efectores antimicrobianos y en el reclutamiento de neutrófilos (Huang y col., 2004; Saijo y col., 2007; Conti y col., 2009). También se han descrito efectos protectores similares de la respuesta Th17 en infecciones por *C. neoformans* y *Pneumocystis carinii* (Kleinschek y col., 2006; Rudner y col., 2007). Sin embargo, existen estudios que contradicen estos resultados (Zelante y col., 2007; Lin y col., 2009), lo que se podría atribuir a la elección del modelo (por ejemplo: infección oral *versus* gástrica, lo que puede sugerir que existen tejidos específicos para los efectos protectores de las respuestas Th17), el tipo de ratón, los mutantes *knock out* probados o las cepas de hongos utilizadas (Vautier y col., 2010).

2.3.3. Respuesta del hongo.

Existen diferentes trabajos en los que se describen los distintos genes, proteínas o rutas que se activan o inducen en los hongos al entrar en contacto con el sistema inmune, para contrarrestar los efectos que sobre ellos ejercen los componentes de la inmunidad. En estudios a gran escala de la interacción de distintos hongos con células sanguíneas se ha descrito la inducción de genes del ciclo del glioxilato (Lorenz y Fink, 2002) como ocurre en el caso de *C. albicans* (Fradin y col., 2003; Lorenz y Fink, 2001), en la que se ha relacionado de forma directa el gen *ICL1*, implicado en este ciclo, con su virulencia (Lorenz y Fink, 2001). Sin embargo, la delección de este gen en un mutante de *S. cerevisiae* no disminuyó su supervivencia *in vivo* (Goldstein y McCusker, 2001), al igual que ocurrió en *C. neoformans* (Rude y col., 2002). El ciclo del glioxilato permite el uso de compuestos de dos carbonos, como el acetato y el etanol, para que la célula los use cuando no hay otra fuente de carbono. En *C. neoformans* se induce el ciclo del glioxilato en el sitio de infección sin necesidad de exponerse a la fagocitosis (Rude y col., 2002). También se han visto inducidos genes característicos de respuestas a estrés y a antioxidantes, proteínas transportadoras de metabolitos entre orgánulos,

enzimas de la gluconeogénesis y las rutas de biosíntesis de metionina y arginina en diferentes hongos (Lorenz y Fink, 2002; Rubin-Bejerano y col., 2003).

3. *S. cerevisiae* como patógeno oportunista.

Como ya se ha comentado, *S. cerevisiae* ha sido considerada como una levadura segura durante mucho tiempo, aunque en los últimos 20 años se ha observado en la bibliografía clínica un aumento en el número de casos descritos de infecciones por este microorganismo en humanos, principalmente en pacientes inmunodeprimidos (Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005). Al no ser una levadura típicamente patógena se conoce poco a cerca de su epidemiología y virulencia.

3.1. Epidemiología de *S. cerevisiae*.

Las infecciones producidas por *S. cerevisiae* se deben a la capacidad de ciertos aislados de *S. cerevisiae* para invadir tejidos y diseminarse (Aucott y col., 1990). De hecho, las cepas aisladas de muestras clínicas parecen tener una mayor virulencia en modelos experimentales animales que las obtenidas de otras fuentes (Clemons y col., 1994). Además, el desarrollo de la infección depende también del estado inmunitario del hospedador. El aumento en el número de personas inmunodeprimidas debido al SIDA y al cáncer, al empleo de agentes y terapias inmunosupresoras y al uso de terapias antimicrobianas continuadas en el tiempo, que debilitan el estado inmunitario de los pacientes (Singh, 2001), ha contribuido al incremento de infecciones fúngicas oportunistas. De hecho, las infecciones por *S. cerevisiae* suelen ocurrir en pacientes con enfermedades de base grave o en situación crítica, incluyendo pacientes con cáncer, trasplantes, neutropenia, SIDA, ingresados en unidades de cuidados intensivos, politraumatizados, quemados, niños prematuros y portadores de sondas nasogástricas o catéteres intravasculares (Bouza y Muñoz, 2004). Sin embargo, también se han registrado infecciones graves producidas por *S. cerevisiae* en pacientes que no mostraban factores de predisposición obvios, sino únicamente haber ingerido alimentos dietéticos que contenían células viables de esta levadura (Jensen y Smith, 1976), así como un caso de fungemia tras un injerto en la aorta en un adulto inmunocompetente (Smith y col., 2002).

El primer caso descrito de infección por *S. cerevisiae* es de 1970, en un paciente con una prótesis en la válvula mitral al que le habían suministrado grandes dosis de antibióticos (Stein y col., 1970). A partir de este momento el número de casos descritos en la bibliografía científica en el que se relaciona a esta levadura con

infecciones ha ido aumentando. Enache-Angouvant y Hennequin (2005) describieron un total de 92 casos documentados de infección invasiva causados por *S. cerevisiae*, de los cuales 15 casos habían sido diagnosticados antes de los años 90, y 77 casos se diagnosticaron posteriormente, observándose así un incremento en los últimos años. En este estudio se observó la existencia de factores de riesgo para la infección, siendo los principales el cateterismo, la terapia antibiótica y la administración del agente probiótico *S. cerevisiae* var. *boulardii*. De hecho, esta levadura se determinó como agente etiológico en un 40,2% de los casos. Muñoz y col. (2005) en un estudio similar también definieron como el principal factor de riesgo para la infección la administración de preparados que utilizaban esta levadura como agente probiótico para prevenir o tratar diarreas. Estudios más recientes muestran como siguen aumentando las infecciones por *S. cerevisiae* (Swinne y col., 2009; Sabino y col., 2010; Arendrup y col., 2011; Chitasombat y col., 2012).

Para la detección de *S. cerevisiae* como agente causal de una infección ha sido muy importante el desarrollo de nuevas técnicas de identificación molecular y sistemas comerciales de caracterización de patógenos. De hecho, en el ámbito hospitalario, existió durante mucho tiempo la tendencia a identificar arbitrariamente cualquier aislado levaduriforme que se obtenía de muestras clínicas dentro del género *Candida* (Smith, 1996; Sobel y col., 1993). Otro factor que ha dificultado el diagnóstico de infecciones por *S. cerevisiae* es la falta de acuerdo en la comunidad científica sobre si la presencia de esta levadura en una muestra clínica es consecuencia de una contaminación, o si es el agente causal de la infección (Byron y col., 1995; Pontón y col., 2000).

3.2. Orígenes de infección y vías de entrada de *S. cerevisiae*.

Es difícil determinar cual es el origen de infección de las levaduras patógenas oportunistas, puesto que la mayoría se encuentran de forma normal en el ambiente que nos rodea e incluso en las mucosas del hospedador. *S. cerevisiae* puede colonizar el tracto respiratorio, genitourinario y gastrointestinal del hombre, sin causar enfermedad (Kwon-Chung, 1992; Salonen y col., 2000). Sin embargo, no se sabe si forma parte de la microbiota del aparato digestivo o se comporta como un comensal transitorio relacionado con la ingestión de alimentos que contienen esta levadura (Enache-Angouvant y Hennequin, 2005). También pueden provenir de la piel de las manos y de las uñas; de hecho se ha demostrado que un porcentaje muy alto del personal sanitario es portador de levaduras en sus manos (Strausbaugh y col., 1994).

Otro posible origen de infección es la ingestión de alimentos, bebidas, y suplementos dietéticos que contengan células vivas de *S. cerevisiae* (Muñoz y col., 2005) y que, junto con una translocación a la sangre, puedan causar fungemia. Un caso de este tipo es la infección sistémica producida por esta levadura tras la ingestión prolongada de un suplemento dietético que contenía entre 10^7 y 10^8 levaduras por gramo (Jensen y Smith, 1976).

Como ya se ha mencionado, se han descrito numerosos casos en los que el origen de la infección es la administración del probiótico *S. cerevisiae* var. *boulardii* (Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005). Este modo de transmisión se facilitaría cuando se dan condiciones que incrementan la población de levaduras en el tracto intestinal o que dañan la mucosa intestinal (Fleet y Roostita, 2006b), como por ejemplo, el uso de antibióticos u agentes quimioterápicos que alteran la mucosa y las defensas del hospedador. La administración del probiótico *S. cerevisiae* var. *boulardii*, no sólo es un factor de riesgo para el paciente al que se le administra, donde existe una relación directa entre infección y administración (Hennequin y col., 2000; Lherm y col., 2002), sino también para otros pacientes ya que la manipulación hospitalaria de los paquetes o cápsulas de este probiótico puede ser foco de infección. De hecho hay algunos casos en los que se ha descrito como pacientes de camas contiguas a otros a los que se les administró el probiótico sufrieron una infección por éste (Perapoch y col., 2000; Lherm y col., 2002; Cassone y col., 2003).

La aspiración de la levadura puede ser también, por tanto, una posible vía de infección, como en el caso de un paciente con SIDA que tuvo una neumonía por *S. cerevisiae*, y en cuya autopsia se encontró esta levadura en diversos órganos sugiriendo que tras una primera colonización orofaríngea del paciente, las levaduras pasaron a los pulmones a partir de donde se extendieron a diversos órganos a través del torrente circulatorio (Tawfik y col., 1989).

Otra posible vía de entrada es la adquisición nosocomial a través de los sitios de inserción de los catéteres intravenosos (Hennequin y col., 2000) que pueden estar contaminados por una manipulación inapropiada por parte del personal sanitario o por una colonización persistente de sus manos (Bouakline y col., 2000; Hennequin y col., 2000; Salonen y col., 2000).

3.3. Tipos de infecciones por *S. cerevisiae*.

S. cerevisiae puede causar una gran variedad de síndromes clínicos, como son: infecciones superficiales, vaginitis, balanitis, neumonía, infección hepatobiliar, peritonitis, esofagitis, infección del tracto urinario, asma, diarreas, celulitis, infección oral y fungemia (Bouza y Muñoz, 2004).

Se han realizado diferentes estudios en los que tras investigar el origen de vaginitis en diferentes poblaciones de mujeres se determinó la incidencia de vaginitis producida por *S. cerevisiae* entre el 0,45% y 1,06% (Odds 1988; Nyirjesy y col., 1995; McCullough y col., 1998).

La fungemia es la manifestación clínica más grave de la infección invasiva por *S. cerevisiae*, y la mejor demostración de su papel patógeno (Cimolai y col., 1987). Suele ocurrir en pacientes en situación crítica (Bouza y Muñoz, 2004) y en un elevado porcentaje de casos en los que al paciente se les había administrado el probiótico *S. cerevisiae* var. *boulardii* o se encontraban en las proximidades de otros pacientes que recibían estos preparados. No se conocen bien los síntomas específicos asociados a la fungemia por *S. cerevisiae*, pero en la mayoría de los casos se observa fiebre, náuseas, malestar y sudores. Es importante destacar que la mayoría de los pacientes con fungemia por *S. cerevisiae* tienen una buena evolución (Cassone y col., 2003).

Existen muy pocos estudios de la sensibilidad de esta levadura a agentes antifúngicos, siendo la anfotericina B y el fluconazol los principales antifúngicos que se utilizan en estas infecciones (Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005; Savini y col., 2008). En un estudio con 76 aislados clínicos de *S. cerevisiae*, se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias a diferentes antifúngicos, detectándose una relativa resistencia de *S. cerevisiae* al fluconazol y al itraconazol que podría dificultar el tratamiento de los pacientes (Zerva y col., 1996). También se ha documentado un caso de tratamiento con caspofungina, en este caso con excelentes resultados (Lolis y col., 2008). Hay que destacar que muchas veces los síntomas de la infección pueden desaparecer cuando se elimina la vía de entrada del microorganismo, ya sea quitando los catéteres intravenosos o suspendiendo la administración oral del agente probiótico o de cualquier producto dietético en el que esté incluida la levadura *S. cerevisiae* (Jensen y Smith, 1976; Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005).

3.4. Rasgos fenotípicos asociados a la virulencia en *S. cerevisiae*.

No se conocen con exactitud los factores de virulencia implicados en las infecciones causadas por *S. cerevisiae* ya que su carácter como patógeno oportunista de baja virulencia y el bajo número de casos clínicos, ha hecho que se haya prestado poca atención al estudio de los mecanismos de virulencia que emplea esta levadura. Clemons y col. (1994) han descrito que los aislados clínicos presentan distintos grados de virulencia al ser ensayados en ratones inmunocompetentes y que, en general, persisten mejor *in vivo* que los aislados no clínicos y se alojan preferentemente en cerebro. La información disponible de diversos rasgos fenotípicos relacionados con la virulencia procede principalmente de estudios *in vitro* comparando aislados clínicos frente a cepas industriales, *a priori* no virulentas (Clemons y col., 1994; McCusker y col., 1994a; Clemons y col., 1996; de Llanos y col., 2006), o bien cepas que han demostrado cierto grado de virulencia en modelo murino con otras que no (McCusker y col., 1994b; de Llanos y col., 2011). Los principales rasgos fenotípicos que se han relacionado potencialmente con la virulencia de *S. cerevisiae* a través de estos estudios comparativos son: el crecimiento a altas temperaturas (McCusker y col., 1994b), la pseudofilamentación (Clemons y col., 1994; McCusker y col., 1994b; de Llanos y col., 2006), la integridad de la pared celular (Muller y col., 2011), la variación fenotípica o *switching* (Clemons y col., 1996), la secreción de enzimas hidrolíticas (McCusker y col., 1994a; de Llanos y col., 2006; de Llanos y col., 2011), la tolerancia a estrés oxidativo (Diezmann y Dietrich, 2009) y la adhesión a células epiteliales (Murphy y Kavanagh, 2001). Estos rasgos son similares a los mencionados anteriormente para otros hongos oportunistas. Algunos de ellos pueden constituir verdaderos factores de virulencia que permitan al patógeno invadir y dañar tejidos del huésped, mientras que otros estarían principalmente implicados en su supervivencia o proliferación.

3.4.1. Crecimiento a altas temperaturas.

La capacidad de crecer a la temperatura corporal, 37°C, y a las temperaturas febriles entre 38° y 42°C, es un requisito muy importante para que las levaduras produzcan infecciones invasivas (van Burik y Magee, 2001). En *S. cerevisiae*, se ha relacionado el origen clínico de los aislados con esta capacidad de crecer a altas temperaturas (Clemons y col., 1994; McCusker y col., 1994a; de Llanos y col., 2006). Además se ha encontrado una relación entre la virulencia en modelo murino de aislados clínicos y su capacidad para crecer a 42°C, siendo estas cepas capaces de infectar y persistir en los ratones (McCusker y col., 1994b; de Llanos y col.,

2011).

Esta propiedad parece no ser debida a un único gen sino a un conjunto de ellos (McCusker y col., 1994a). Entre los genes que parecen estar implicados en la termotolerancia de *S. cerevisiae* están *CDC19* que codifica una piruvato kinasa implicada en la glucólisis (Benjaphokee y col., 2012), *HSP104* (Lindquist y Kim 1996) y *HSP90(HSP82)* (Borkovich y col., 1989; Cheng y col., 1992) que codifican chaperonas inducibles por choque térmico. Este último, además ha sido relacionado con la virulencia, ya que su sobreexpresión en una cepa de laboratorio de *S. cerevisiae* aumentó significativamente su virulencia en ratones tanto en términos de los recuentos de colonias en riñón, hígado y bazo como en términos de mortalidad (Hodgetts y col., 1996). Esta sería la primera evidencia de que la proteína Hsp90 podría ser un factor de virulencia en *S. cerevisiae* (Hodgetts y col., 1996).

3.4.2. Pseudofilamentación.

Algunas cepas diploides de *S. cerevisiae* pueden manifestar una transición morfológica en determinadas condiciones ambientales, pasando de forma levaduriforme a forma pseudohifal (figura 3). Esto conlleva cambios en el patrón de gemación (pasando de un patrón bipolar a uno unipolar) y en la morfología celular (Gimeno y col., 1992; Gancedo, 2001). Esta transición morfológica parece permitir a las células vegetativas buscar nutrientes bajo condiciones ambientales adversas; además, aumenta la adhesión tanto célula-célula, como célula-sustrato y la capacidad de penetrar en el sustrato (Chen y Thorner, 2007). Algunos de los cambios en el medio que pueden producir esta pseudofilamentación son la limitación de nitrógeno, la presencia de una fuente abundante de carbono, altas

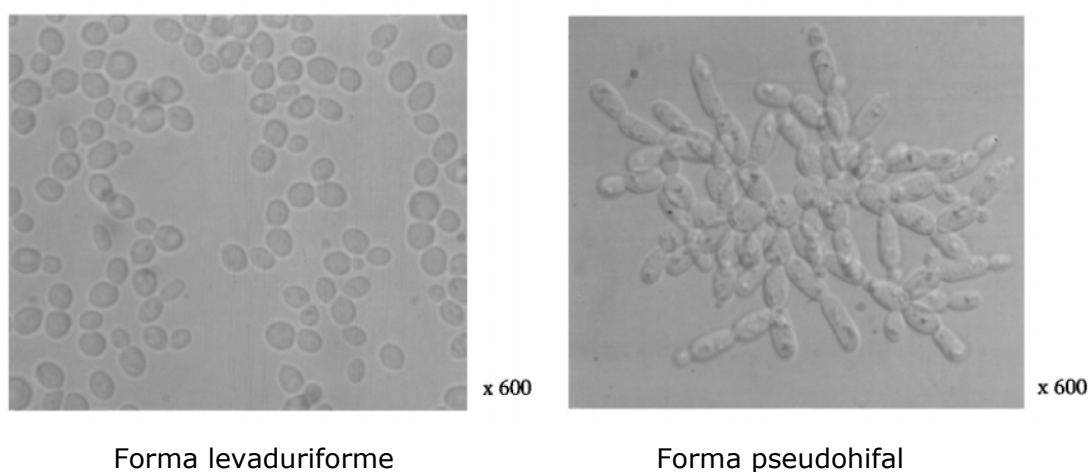


Figura 3. Dimorfismo en *S. cerevisiae*. Adaptada de Miyake y col. (2003).

temperaturas (37°C), estrés osmótico, y la presencia de algunos alcoholes y antibióticos (Lorenz y col., 2000; Zaragoza y Gancedo, 2000; Gagiano y col., 2002; Miyake y col., 2003).

Se ha observado que los aislados clínicos de *S. cerevisiae* muestran mayor tendencia al crecimiento pseudohifal que otros aislados no clínicos ante condiciones limitantes de nutrientes (Clemons y col., 1994; McCusker y col., 1994b; de Llanos y col., 2006; Muller y col., 2011). Además, Muller y col. (2011), en un estudio genómico con 44 cepas clínicas y 44 no clínicas, identificaron polimorfismos asociados a las cepas clínicas en la secuencia que codifica a los genes *VRP1*, *KIC1*, *SBE22*, *PDR5* e *YGR146C*, lo que relacionaron con la pseudofilamentación, la integridad de la pared celular y la detoxificación celular.

Algunas cepas de *S. cerevisiae*, además de desarrollar pseudohifas en su estado diploide, son capaces en su estado haploide de invadir las placas de YPD produciendo filamentos resistentes al lavado vigoroso de las superficies de las placas de agar (Roberts y Fink, 1994; Dickinson, 2008). Esta característica se denomina crecimiento invasivo y parece incrementarse al crecer los cultivos a alta temperatura (37-39°C) (Zupan y Raspor, 2010).

En *S. cerevisiae*, el crecimiento pseudohifal en condiciones de limitación de nutrientes está regulado por varias rutas: la del cAMP-PKA (adenosin monofosfato cíclico-proteína kinasa A), la de la MAP (*Mitogen Activated Protein*) kinasa Kss1 y la de la Snf1/AMPK (proteína kinasa activada por AMP). Estas rutas están interconectadas y regulan entre otros genes al gen *FLO11*, que codifica una glicoproteína de superficie celular implicada tanto en el crecimiento pseudohifal, como en la adhesión celular y en el crecimiento invasivo (Lambrechts y col., 1996; Gancedo, 2001).

Las rutas de transducción de señales se encargan de responder a las señales que la célula recibe desde el exterior (cambios en la composición del medio, temperatura, presencia de determinados compuestos u hormonas, estrés físico, etc.) al núcleo, activando finalmente los mecanismos necesarios para conseguir la adaptación y supervivencia celular. Entre ellas, las rutas de MAP Kinasas (MAPK) están implicadas en diferentes aspectos de la regulación celular y se encuentran muy conservadas en la evolución. Los elementos básicos de este tipo de rutas son la MAPK, la kinasa de la MAPK (MAPKK) y la kinasa de la MAPKK (MAPKKK), y su activación se produce por fosforilación sucesiva de estos tres elementos (Widmann y col., 1999; Turjanski y col., 2007). Una vez activada la MAPK, ésta transmite la señal fosforilando otras proteínas, generalmente proteínas kinasas y factores de transcripción que desencadenarán la respuesta necesaria. Además, existen otras proteínas que no están implicadas directamente en la transmisión de la señal a

través de estas rutas, pero que influyen en su actividad y regulación, como son las proteína fosfatasa (Martín y col., 2005).

En *S. cerevisiae* se conocen cinco MAPKs involucradas en la respuesta a diversos estímulos celulares y se denominan Hog1, Fus3, Kss1, Slt2 y Smk1, tal y como se muestra en la figura 4. Hog1 está encargada de la respuesta celular que se produce cuando se detecta alta osmolaridad en el medio. Fus3 está relacionada con el apareamiento que tiene lugar en respuesta a feromonas. Slt2 se encarga de generar la respuesta necesaria para mantener la integridad celular ante estímulos agresivos para la pared celular. Smk1 está implicada en la formación de la pared de la espora y Kss1 está involucrada en el crecimiento pseudofilamentoso o invasivo (Chen y Thorner, 2007). Esta MAPK está también implicada en la ruta de apareamiento y es responsable de la respuesta a determinados daños en la pared celular.

Un esquema de la ruta de pseudofilamentación se muestra en la figura 5. Los receptores de superficie descritos de esta ruta son Sho1 y Msb2, que forman complejos que se requieren para el crecimiento pseudofilamentoso (O'Rourke y Herskowitz, 1998; Chen y Thorner, 2007). La señal sería transmitida a la GTPasa Ras2, que activa a la proteína Cdc24 para que transmita la señal activando a la GTPasa Cdc42. Esta última es esencial para activar a la proteína Ste20 (Peter y col., 1996; Leberer y col., 1997). Las proteínas Bmh1 y Bmh2 se asocian con

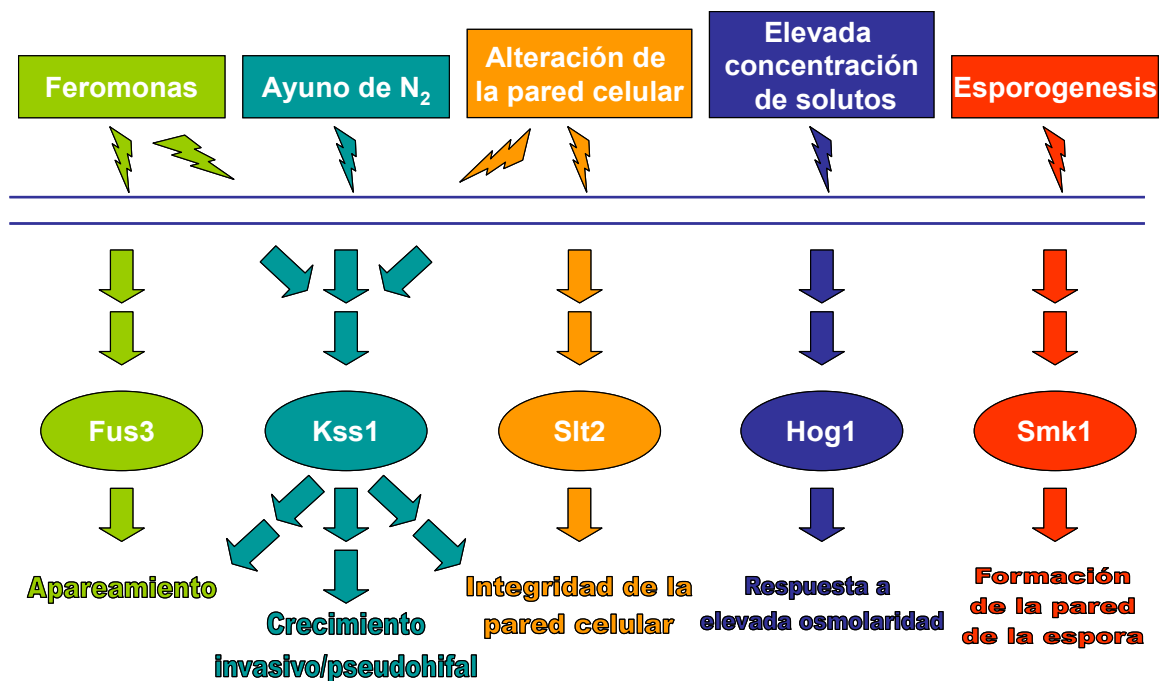


Figura 4. Rutas de MAPKs en *S. cerevisiae*. Estímulos que las activan y respuestas que generan.

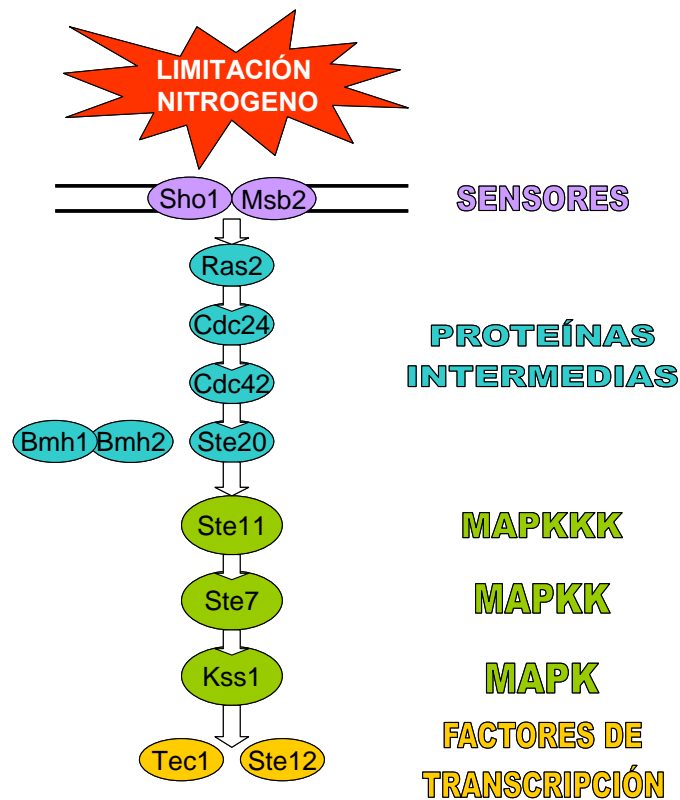


Figura 5. Esquema de la ruta de MAPKs de pseudofilamentación en *S. cerevisiae*.

Ste20. A continuación, Ste20 transmite la señal al módulo de MAPK compuesto por Ste11 y Ste7, y la MAPK Kss1. Esta última MAPK promueve la transcripción de genes implicados en la pseudofilamentación o el crecimiento invasivo como *FLO11* (Roberts y col., 2000). Se requiere la asociación de los factores de transcripción Ste12 y Tec1 para la transcripción de estos genes.

La ruta del cAMP-PKA es otra de las rutas que regulan la pseudofilamentación. Además se encarga de detectar nutrientes del medio como la glucosa y la sacarosa y regular diversos procesos biológicos incluyendo el crecimiento, metabolismo y la resistencia a estrés (Lemaire y col., 2004). El receptor Gpr1 detecta las condiciones nutricionales del medio y trasmite la señal al interior celular a través de la proteína Gpa2. Las proteínas Gpa2 y Ras2 activan la adenilato ciclasa (Cyr1) que se encarga de la síntesis de AMPc que modula positivamente la actividad de las proteínas kinasas Tpk1, Tpk2 y Tpk3, las cuales controlan la activación del factor de transcripción Flo8, que regula en último término la expresión del gen *FLO11* (Van de Velde y Thevelein, 2008). Un esquema de esta ruta puede verse en la figura 6.

La ruta Snf1/AMPK está implicada en el crecimiento pseudohifal y en el crecimiento invasivo, además también participa en la señalización de nitrógeno (Cullen y Sprague, 2000; Orlova y col., 2010). La proteína kinasa Snf1 es requerida

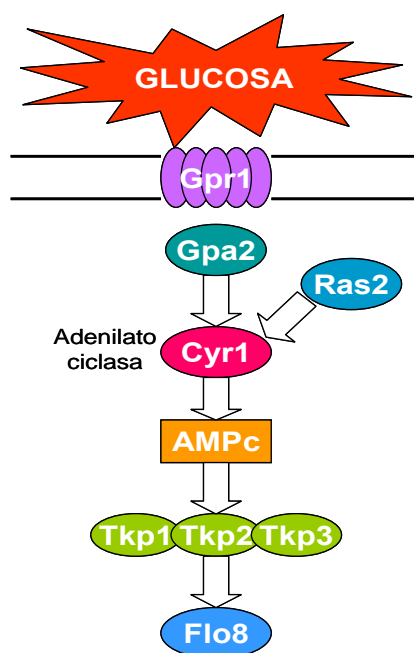


Figura 6. Esquema de la ruta del AMPc en *S. cerevisiae*.

para la adaptación de la levadura a una limitación de glucosa en el medio, activándose ante esta limitación (Wilson y col., 1996), además de para usar otras fuentes carbono como la sacarosa, la galactosa o el etanol (Hedbacker y Carlson, 2008). Esta kinasa es activada también en respuesta a otros estreses ambientales, como el estrés ante iones de sodio, pH alcalino o estrés oxidativo (Hong y Carlson, 2007). La activación catalítica de Snf1 se produce a través de su fosforilación por las proteínas kinasas Sak1, Tos3 y Elm1 (Orlova y col., 2010).

Otros procesos relacionados con el crecimiento filamentoso de *S. cerevisiae* son la adhesión a superficies abióticas y la formación de biopelículas. Existen cepas de *S. cerevisiae* capaces de iniciar la formación de biopelículas en medios con bajo contenido en glucosa y semi-sólido (0,3% agar) (Reynolds y Fink, 2001). Las biopelículas se forman mediante la agregación de microorganismos en estructuras multicelulares que se adhieren a diferentes superficies, como superficies plásticas. En *S. cerevisiae* tanto en la fijación al plástico como en la formación de las biopelículas también está implicado el gen *FLO11* (Ryan y col., 2012).

3.4.3. Integridad de la pared celular.

La pared celular es un elemento clave en la célula de levadura puesto que se encarga de darle forma y soporte físico, y además tiene una función protectora. Como ya se ha comentado, la integridad de la pared celular ha sido relacionada con el origen clínico de aislados de *S. cerevisiae* mediante identificación de polimorfismos de genes relacionados con su mantenimiento (Muller y col., 2011).

La ruta de integridad celular mediada por la MAPK Slt2 es la encargada de generar la respuesta necesaria para mantener la integridad celular ante estímulos agresivos para la pared. Un esquema de la ruta de integridad celular se muestra en la figura 7. Los receptores de superficie descritos para esta ruta son las proteínas de membrana Mid2, Mtl1 y 3 proteínas de la familia WSC (*Wall integrity and Stress response Components*), Wsc1, Wsc2 y Wsc3 (Levin, 2011). Estas proteínas detectan agresiones en la pared celular, provocando la activación de la GTPasa Rho1 que a su vez activa la protein kinasa Pkc1. La señal sería transmitida al módulo de MAPK compuesto por la MAPKKK Bck1, las MAPKK Mkk1 y Mkk2 y la MAPK Slt2 (Martín y col., 2000; Molina y col., 2010). Slt2 activa por fosforilación al factor de transcripción Rlm1 que está implicado en la expresión de genes relacionados con la síntesis y el ensamblaje de la pared celular. Estos genes codifican fundamentalmente proteínas estructurales de la pared celular como proteínas de tipo GPI o Pir, y otras involucradas en la biosíntesis de la pared o en el ensamblaje de sus componentes (García y col., 2004).

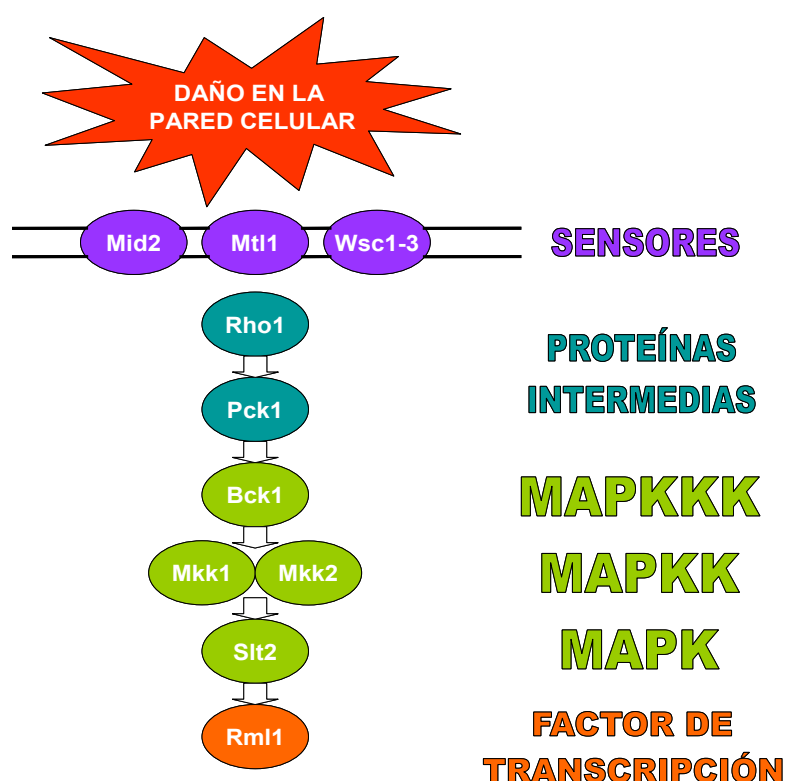


Figura 7. Esquema de la ruta de MAPKs de integridad celular en *S. cerevisiae*.

3.4.4. Variación fenotípica o *switching*.

El fenómeno de *switching* es un mecanismo de plasticidad fenotípica desarrollado por diferentes microorganismos para adaptarse rápidamente a las diferentes condiciones ambientales. Este fenómeno se manifiesta como un cambio

en el aspecto colonial y es un proceso reversible. Aunque parece proporcionar ventajas a los patógenos, no se conoce con exactitud el papel que juega en la infección ni en la virulencia (van Burik y Magee, 2001).

En *S. cerevisiae*, este fenómeno ocurre *in vitro* de forma espontánea y con mayor frecuencia entre los aislados clínicos y virulentos de esta especie, observándose en ellos varios fenotipos coloniales reversibles (Clemons y col., 1996). Por el contrario, en las cepas avirulentas se observa un único fenotipo de colonia y mayor frecuencia de colonias *petites* no reversibles (compuestas por células deficientes en la respiración debido a las deleciones en el ADN mitocondrial o a su pérdida completa) (Clemons y col., 1996). Parece existir una relación inversa entre la frecuencia de aparición de colonias *petites* y la virulencia de la cepa (Weger y col., 2002). Además las levaduras de las colonias *petites* parecen ser menos virulentas en modelo murino que las levaduras de los fenotipos predominantes (Weger y col., 2002).

3.4.5. Secreción de hidrolasas extracelulares.

La secreción de enzimas hidrolíticas proporciona a la célula fúngica acceso a nutrientes del medio, ya que estas enzimas actúan degradando las barreras estructurales de las células del hospedador. De esta manera, alteran su función y/o viabilidad, facilitando así la invasión a los tejidos. Entre las enzimas hidrolíticas estudiadas por su posible implicación en la virulencia de *S. cerevisiae*, se encuentran las proteasas y las fosfolipasas (McCusker y col., 1994a; de Llanos y col., 2006). Aunque la secreción de proteasas se ha relacionado con la virulencia en *Candida*, los estudios de McCusker y de Llanos han mostrado que no parece existir una relación directa entre la secreción de este tipo de enzimas hidrolíticas y la virulencia de *S. cerevisiae*, ni tampoco con el carácter clínico de las cepas recuperadas de enfermos (McCusker y col., 1994a; de Llanos y col., 2006). Sin embargo, en el caso de las fosfolipasas, se ha observado un mayor nivel de secreción de estas enzimas por aislados clínicos de *S. cerevisiae* (de Llanos y col., 2006), lo que además se ha relacionado con la capacidad de virulencia en modelo murino (de Llanos y col., 2011).

3.4.6. Tolerancia a estrés oxidativo.

Los microorganismos experimentan el estrés oxidativo en muchos entornos, incluyendo el organismo hospedador en el proceso de infección. La tolerancia al estrés oxidativo es un aspecto importante en la patogénesis ya que el sistema inmunológico humano somete a este tipo de estrés a los microorganismos durante la fagocitosis. En el caso de *S. cerevisiae*, la resistencia al estrés oxidativo se ha

relacionado con el origen clínico de las cepas (Diezmann y Dietrich, 2009) y con la virulencia (Llopis y col., 2012).

Las especies reactivas de oxígeno producen este tipo de estrés y pueden alterar la estructura y función de proteínas. Para mantener en niveles no tóxicos a estas especies reactivas del oxígeno, *S. cerevisiae* posee diferentes enzimas detoxificantes como son catalasas (Ctt1 y Cta1), superóxido dismutasas (Sod1 y Sod2) y peroxidasas (Gpx1, Gpx2, Gpx3, Tsa1, Tsa2, Ahp1, Prx1 y Dot5) (Herrero y col., 2008). A nivel transcripcional, los factores de transcripción Yap1, Skn7 y Msn2/4 son los que están principalmente involucrados en la respuesta a estrés oxidativo (Gasch y col., 2000). Llopis y col. (2012) demostraron que la mutación de Yap1 en una cepa de *S. cerevisiae* virulenta para el ratón, provoca su incapacidad para resistir el estrés oxidativo y, como consecuencia, una disminución de su supervivencia en presencia de sangre humana. Además, Diezmann y Dietrich investigaron la base genética de la supervivencia al peróxido de hidrógeno en esta levadura identificando que el factor de transcripción Rds2 contribuye a la respuesta a este estrés (Diezmann y Dietrich, 2011).

3.4.7. Adhesión.

La capacidad de adhesión a las células epiteliales y endoteliales de las levaduras patógenas es un factor importante para permitirles colonizar, penetrar e invadir el tejido del hospedador. En el caso de *S. cerevisiae*, ha sido descrita una limitada capacidad de adhesión de aislados tanto clínicos como no clínicos a células tanto endoteliales como epiteliales (Klingberg y col., 2008; Yáñez y col., 2009), además se ha relacionado una mayor adhesión de aislados clínicos de esta levadura a células epiteliales (Murphy y Kavanagh, 2001).

La capacidad de adhesión a superficies plásticas como los catéteres puede ser un rasgo con posible asociación a la virulencia de *S. cerevisiae* ya que se han descrito estos catéteres como posible origen de infección por el probiótico *S. cerevisiae* var. *boulardii* (Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005; Muñoz y col., 2005). Además, otras cepas de *S. cerevisiae* introducidas en el ambiente hospitalario también podrían terminar adheriéndose a los catéteres y ser origen de infección (Fleet y Roostita, 2006b; Clemons y col., 2010). Este rasgo está relacionado con la formación de biopelículas las cuales han sido descritas en *S. cerevisiae* por Reynolds y Fink (2001).

4. La pared celular de *S. cerevisiae*.

Como se ha comentado anteriormente, la pared celular de las levaduras mantiene la forma de la célula protegiéndola de las tensiones osmóticas y físicas y limitando su permeabilidad (Orlean, 2012). Además, juega un papel muy importante en la interacción con otras células y con el medio ambiente e informa del estado externo a la célula (Klis y col., 2006).

El estudio de la pared celular es interesante para conocer el papel fundamental que tiene en la fisiología de la levadura. Uno de los aspectos más interesantes es el estudio de la interacción del hongo con el hospedador ya que la pared celular es el primer sitio de contacto entre ambos. Algunas de las proteínas que se encuentran en esta estructura externa están relacionadas con la adhesión, la antigenicidad y la regulación de la respuesta inmune (Hernández y col., 2010). La búsqueda de nuevos antifúngicos es otra de las aplicaciones del estudio de la pared celular ya que es una muy buena diana debido a su esencialidad y a su inexistencia en células de mamífero (Groll y col., 1998a; Groll y col., 1998b; Dodds y col., 2000; Theis y Stahl, 2004).

La estructura de la pared celular tiene un carácter dinámico cambiando profundamente en procesos como el apareamiento, la pseudofilamentación, el crecimiento invasivo, la adhesión a superficies abióticas y en respuesta a variaciones de las condiciones de crecimiento (disponibilidad de nutrientes, temperatura, pH, nivel de oxígeno) o a agresiones externas.

La pared celular de *S. cerevisiae* constituye el 20% del peso seco de la célula. Está constituida principalmente por polisacáridos y proteínas, encontrándose en un 40-50% las manoproteínas, en un 30-45% el β -1,3-glucano, en un 5-10% el β -1,6-glucano y en un 1,5-6% la quitina (Klis y col., 2006). La pared celular está formada por dos capas (figura 8), una capa externa formada principalmente por manoproteínas y una interna formada por una red tridimensional de polisacáridos, en su mayoría β -1,3-glucano que puede estar unido en sus extremos reductores a β -1,6-glucano o a quitina, esta última localizada en la parte más interna confiriéndole elasticidad y resistencia a la tensión a la pared celular (Klis y col., 2006; Orlean, 2012).

Las manoproteínas son moléculas de alto peso molecular sintetizadas intracelularmente y transportadas al exterior celular mediante rutas de secreción, a través de las cuales sufren N- y O-glicosilaciones. Las manoproteínas que forman la capa más externa desempeñan un papel fundamental en la comunicación con el medio ambiente y en el contacto, tanto biótico como abiótico. Algunas de estas proteínas superficiales están implicadas en la adhesión célula-célula y célula-

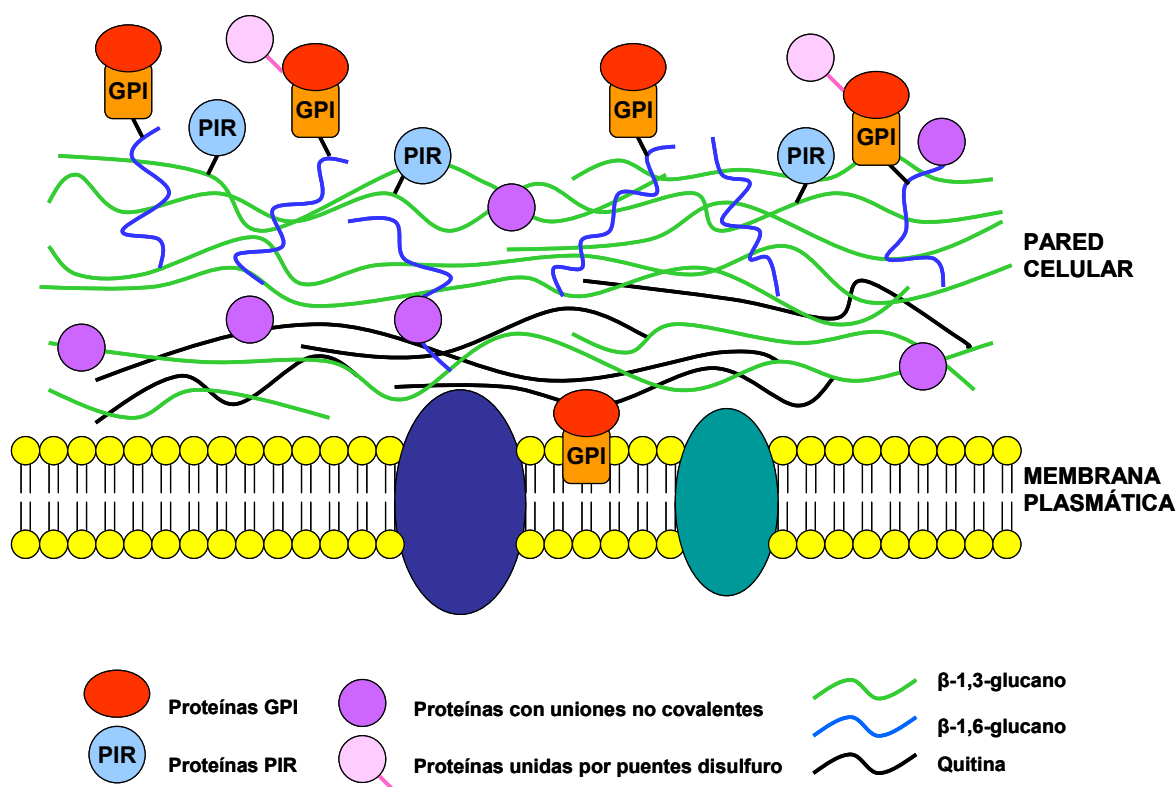


Figura 8. Representación esquemática de la organización de la superficie celular.

superficie, por lo que suelen denominarse adhesinas (Xie y Lipke, 2010). Las manoproteínas pueden estar unidas a la estructura de la pared celular mediante diferentes enlaces: las proteínas GPI pueden estar unidas de forma covalente al β-1,6-glucano que, a su vez, está unido al β-1,3-glucano, aunque también pueden estar ancladas en la membrana plasmática; las proteínas Pir están unidas de forma covalente al β-1,3-glucano; y otras proteínas se unen mediante enlaces débiles no covalentes a la pared celular o mediante puentes disulfuro a otras proteínas unidas covalentemente (Lesage y Bussey, 2006).

Las proteínas GPI tienen un péptido señal localizado en el extremo N-terminal que dirige su entrada en la ruta de secreción, además son ricas en residuos de serinas y treoninas y poseen una señal de anclaje mediante glicosilfosfatidil inositol (GPI) en el extremo C-terminal. Estos lípidos GPI se sintetizan en el retículo endoplasmático y son añadidos a las proteínas (Pittet y Conzelmann, 2007). Estas proteínas pueden extraerse de la pared celular mediante β-1,3-glucanasas y β-1,6-glucanasas. En *S. cerevisiae* se han identificado mediante análisis bioinformático 66 posibles proteínas GPI (De Groot y col., 2003), aunque experimentalmente en la superficie celular se han identificado un número menor, entre ellas Ecm33, Gas1, Gas3, Gas5, Crh1 y Crh2 (Yin y col., 2005; Insenser y col., 2010).

Las proteínas Pir tienen un péptido señal localizado en el extremo N-terminal, presentan secuencias con varias repeticiones internas y contienen una señal de

procesamiento para la proteasa Kex2. Pueden extraerse tanto mediante β -1,3-glucanasas como por tratamiento con álcali fuerte. En *S. cerevisiae* se han identificado varias como Pir1, Pir2/Hsp150, Pir3 y Cis3/Pir4 (Ecker y col., 2006). Algunas de estas proteínas Pir además de unidas covalentemente también han sido encontradas unidas de forma débil a la pared celular (Yin y col., 2005).

Las proteínas unidas de forma débil pueden extraerse de la pared celular mediante tratamiento con SDS (dodecil sulfato sódico) o con agentes reductores como el DTT (ditiotreitól). Entre estas proteínas se encuentran proteínas como Bar1, Aga2 y Scw3 (Yin y col., 2005) y proteínas sin péptido señal que no se esperaría que estuviesen en la pared celular, como proteínas glicolíticas (Eno1, Pgk1, Adh1, Tdh1, Tdh2, Tdh3) o proteínas de choque térmico (Hsp90 y Hsp70). Estas proteínas se han encontrado en la pared celular usando diferentes estrategias lo que confirma esta inusual localización celular (Pardo y col., 1999; Pardo y col., 2000a; Delgado y col., 2003; López-Villar y col., 2006; Nombela y col., 2006; Insenser y col., 2010).

5. Proteómica.

En los últimos años se ha producido un gran avance tecnológico que ha hecho que se hayan podido desarrollar estrategias para el análisis de procesos biológicos a gran escala, como son la genómica, la transcriptómica, la proteómica o la metabolómica. La proteómica estudia de forma global las proteínas codificadas por los genes de un genoma, teniendo en cuenta su función, su estructura y su relación con otras macromoléculas (Graves y Haystead, 2002). Así el estudio del proteoma es el estudio del conjunto de proteínas expresadas en la célula en un momento determinado bajo unas condiciones ambientales concretas. A diferencia del genoma, que siempre es el mismo, existen múltiples proteomas ya que la célula expresará unas proteínas u otras en función de las condiciones en las que se encuentre. Además, los genes pueden dar lugar a diferentes formas proteicas por lo que existe un número mucho mayor de proteínas que de genes en una célula.

La proteómica tiene diferentes aplicaciones en biomedicina como son la caracterización de mecanismos moleculares implicados en la patogenia de enfermedades, la identificación de dianas farmacológicas, de nuevos marcadores para diagnóstico de enfermedades o de microorganismos en microbiología clínica (Muñoz Bellido y col., 2012; Russell y col., 2013).

La proteómica se fundamenta en dos tipos de técnicas: las técnicas de separación de proteínas y las técnicas de identificación y caracterización de éstas mediante espectrometría de masas (Aebersold y Mann, 2003). Dichas técnicas,

junto con la bioinformática, en la que se apoya toda esta tecnología tanto para su desarrollo como para el análisis, interpretación e integración de la enorme cantidad de datos obtenidos, son los pilares básicos de los estudios proteómicos (Monteoliva, 2008).

Las técnicas de separación de proteínas con mayor resolución son la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida y la cromatografía multidimensional.

- La electroforesis bidimensional realiza la separación de proteínas en primer lugar por punto isoeléctrico en un gradiente de pH inmovilizado y en segundo lugar por peso molecular en un gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Issaq y Veenstra, 2008). Esta técnica de separación de proteínas tiene limitaciones ya que no tiene buena resolución para las proteínas muy grandes, muy ácidas o muy básicas.
- La cromatografía multidimensional es una técnica que tiene una alta resolución, separa péptidos digeridos enzimáticamente mediante columnas cromatográficas de intercambio iónico y las fracciones eluidas son separadas por microcolumnas de fase reversa (Gao y col., 2010).

La identificación de proteínas se realiza mediante espectrometría de masas que permite conocer la masa molecular de un analito de una forma muy precisa determinando la relación masa/carga (m/z) de las moléculas (Patterson, 2001). La espectrometría de masas se basa en la formación de iones del analito en fase gaseosa, que son separados y detectados según su m/z , lo que genera un espectro de masas en el que se representa la abundancia relativa de cada uno de estos iones en función de su m/z . Los espectrómetros de masas constan básicamente de tres partes: la fuente de ionización donde se producen los iones en fase gaseosa, el analizador donde se separan los iones en función de su m/z y el detector donde se detectan los iones en función de la proporción de su abundancia que posteriormente se convierten en picos de un espectro de masas.

El análisis de las proteínas mediante espectrometría de masas ha sido posible gracias al desarrollo de varios métodos de ionización suave para convertir biomoléculas grandes, polares y no volátiles en iones en fase gaseosa: MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) y ESI (*Electro Spray Ionization*) (Cañas y col., 2006).

Para la identificación de proteínas normalmente se analizan los péptidos obtenidos de la digestión enzimática por una diana de corte reconocida por proteasas como la tripsina, utilizando dos estrategias:

- Análisis de las masas de los péptidos o “huella peptídica” (PMF, *Peptide Mass Fingerprinting*). Tras la digestión triptica de una proteína se obtiene un conjunto de péptidos de tamaños determinados por su secuencia de aminoácidos y que la caracteriza como si de una huella se tratase (debido a que la tripsina corta específicamente después de los aminoácidos lisina y arginina). Los espectros generados por las masas de los péptidos son comparados con las masas teóricas de las digestiones de las proteínas de las bases de datos (Pappin y col., 1993).
- Análisis de las masas resultantes de la fragmentación de los péptidos. La interpretación de los espectros de fragmentación nos permitirá la identificación de fragmentos proteicos por comparación con espectros teóricos de las proteínas de las bases de datos, o por secuenciación “de novo” u obtención de la secuencia mediante interpretación directa del espectro. Esta estrategia es la única viable en caso de no conocerse la secuencia del organismo a estudiar o de sólo conocerse la de algún organismo homólogo (Patterson y Aebersold, 1995).

Existen dos tipos fundamentales de aproximaciones proteómicas, las basadas en el uso de geles (*gel-based proteomics*) y las que no utilizan geles (*gel-free proteomics*) (Patterson, 2001).

- En las que usan gel, una mezcla proteica se separa en un gel mediante electroforesis bidimensional. Este gel se tiñe y analiza para determinar cuales son las proteínas de interés que son escindidas del gel y digeridas con tripsina. Los péptidos que resultan de esta digestión son analizados por espectrometría de masas para la identificación de cada proteína por huella peptídica o fragmentación.
- En las que no utilizan gel, una mezcla proteica es digerida con tripsina en solución, obteniéndose una mezcla muy compleja de péptidos de todas las proteínas iniciales de la mezcla. Esta solución de péptidos es separada mediante técnicas cromatográficas que normalmente están acopladas a espectrómetros de masas que fragmentan los péptidos separados para su posterior identificación.

Estas técnicas se pueden utilizar para distintas aproximaciones proteómicas como:

- El estudio del proteoma de un organismo o tipo celular con fines descriptivos o para conocer la función de las proteínas, (Shevchenko y col., 1996).
- El estudio de subproteomas, donde se realizan fraccionamientos celulares previos a la separación de proteínas. Este fraccionamiento puede ser en función de su localización subcelular para conocer las proteínas de un orgánulo o

estructura celular, (Monteoliva, 2008).

- El estudio de las proteínas que varían su expresión entre dos estados celulares, mediante la cuantificación del cambio relativo de expresión de cada proteína, pudiendo así conocer las diferencias fisiológicas entre ambos estados. Esto es lo que se denomina proteómica de expresión diferencial y entre las principales técnicas que se usan están, entre las que usan geles: 2D-DIGE (*two-Dimensional Difference In-Gel Electrophoresis*) e inmunoproteómica; y entre las que no usan gel: SILAC (*Stable Isotope Label Amino acids Culture*) e iTRAQ (*Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*).
 - 2D-DIGE, en la que se realiza un marcaje de los diferentes extractos proteicos con distintos fluorocromos y se realiza la separación mediante electroforesis bidimensional (Monteoliva y Albar, 2004). Esta técnica se comenta con mayor detalle en el siguiente apartado.
 - La inmunoproteómica se utiliza para conocer el inmunoma, entendiéndose como la parte del proteoma que actúa como diana del sistema inmunitario (Wilson y col., 2004). Con ella se identifican proteínas antigénicas que pueden servir como potenciales biomarcadores para el diagnóstico.
 - SILAC, en la que se realiza un marcaje *in vivo* mediante crecimiento del cultivo en medios con lisina, arginina, metionina o tirosina marcadas con isótopos ligeros y pesados. Tras la digestión de las muestras, los péptidos se separan mediante cromatografía multidimensional (Ong y col., 2002).
 - iTRAQ, en la que se marcan los péptidos obtenidos tras la digestión con tripsina con distintas etiquetas isobáricas. Estos péptidos se separan posteriormente mediante cromatografía multidimensional (Ross y col., 2004).
- El estudio de complejos proteicos para conocer las proteínas que lo integran y su función. Una de las técnicas proteómicas para este estudio es la denominada 2D-Blue Native/SDS-PAGE, que se realiza mediante la separación de los complejos en geles bidimensionales, siendo la primera dimensión no desnaturalizante (Wittig y Schagger, 2008).
- El estudio de las modificaciones post-traduccionales, que es muy importante para conocer como se regula la actividad, localización subcelular, estabilidad y función de las proteínas (Jensen, 2004). Existen más de 300 modificaciones post-traduccionales diferentes implicadas en numerosos procesos biológicos. Una de las más ampliamente estudiada es la fosforilación, ya que muchos procesos biológicos están regulados por esta modificación. Su estudio a nivel global se denomina fosfoproteómica.

Algunas de las técnicas utilizadas en este trabajo se detallan a continuación.

5.1. Análisis proteómico de expresión diferencial 2D-DIGE.

Existe un amplio abanico de aplicaciones de la proteómica de expresión diferencial en microbiología de patógenos, como son los estudios de determinantes de virulencia en microorganismos infecciosos y los estudios de la relación microorganismo-hospedador. Por ejemplo, se han realizado diferentes estudios proteómicos de expresión diferencial mediante el sistema 2D-DIGE en *C. albicans*, como el estudio entre la forma levaduriforme y la hifal, importante en el proceso de invasión e infección de esta levadura (Monteoliva y col., 2011), o el estudio de la respuesta de los macrófagos ante *C. albicans* (Reales-Calderon y col., 2012).

En el sistema 2D-DIGE se utilizan los fluorocromos Cy3, Cy5 y Cy2 (*CyDye DIGE Fluor minimal dyes*) que han sido diseñados con el mismo peso molecular y la misma carga para asegurar que las proteínas comunes de las muestras proteicas tengan la misma movilidad relativa en un gel bidimensional (Tonge y col., 2001). Los fluorocromos tienen un grupo éster reactivo NHS, y están diseñados para formar un enlace covalente con el grupo ϵ -amino de las lisinas en las proteínas a través de un enlace tipo amida. El colorante es añadido a la proteína de tal manera que la cantidad de fluorocromo está restringida en la reacción de marcaje. La proporción utilizada asegura que el fluorocromo marque aproximadamente un 1-2% de los residuos de lisina, de tal manera que cada proteína marcada lleve sólo una molécula de colorante y sea visualizada como una mancha proteica individual. Por lo tanto, los fluorocromos sólo marcan una pequeña proporción de la proteína total de una muestra y por eso este tipo de marcaje se ha llamado marcaje "mínimo".

El aminoácido lisina en las proteínas lleva una carga intrínseca de +1 a pH neutro o ácido. Los fluorocromos también llevan una carga +1 que, cuando se asocian a lisina, sustituyen la carga +1 de la lisina por la suya propia, asegurando que el punto isoeléctrico de la proteína no se altera de forma significativa.

Dos de los fluorocromos (Cy3 y Cy5) se utilizan para marcar las muestras de las diferentes condiciones a comparar, mientras que el Cy2 se usa para marcar un estándar interno compuesto de una mezcla de todas las muestras que componen el experimento, y que se procesa en cada uno de los geles. Este sistema se ha desarrollado para disminuir la variación intrínseca entre geles, que es una de las limitaciones del estudio clásico de expresión diferencial en el que cada muestra a comparar se separa en un gel diferente. Además, el marcaje fluorescente mejora la cuantificación y tiene un rango dinámico lineal de cuatro o cinco órdenes de magnitud en comparación con otros métodos de tinción. Gracias a que cada uno de los fluorocromos se excita y emite a una longitud de onda diferente, la imagen de cada una de las condiciones puede adquirirse de manera individualizada, excitando

la muestra en las longitudes de ondas específicas para cada uno de los fluorocromos. (figura 9). Todas estas ventajas, junto con el análisis estadístico que se aplica, hace esta técnica muy adecuada para el estudio de la expresión diferencial de proteínas.

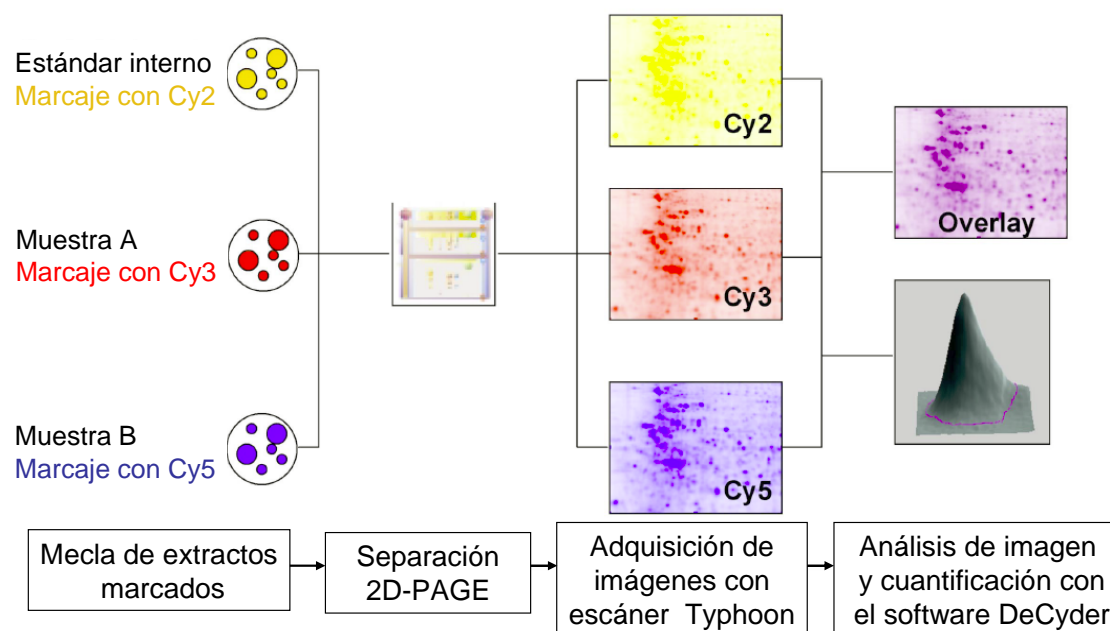


Figura 9. Flujo de trabajo del sistema 2D-DIGE. Modificado de *Ettan DIGE System User Manual* (GE Heathcare).

5.2. Inmunoproteómica.

El inmunoma puede definirse como la parte del proteoma que actúa como diana del sistema inmunitario (Wilson y col., 2004). La caracterización del inmunoma de un agente infeccioso bajo una determinada condición fisiológica, patológica o farmacológica se puede realizar mediante el análisis del proteoma serológico (SERPA, acrónimo del inglés *SERological Proteome Analysis*) (Seliger y Kellner, 2002).

Para llevar a cabo este análisis del proteoma serológico se separa una mezcla proteica del agente infeccioso que puede ser total o una fracción mediante electroforesis bidimensional y se realiza un *Western blotting* o *immunoblotting* para detectar las proteínas que reaccionan con los anticuerpos presentes en sueros obtenidos frente a la infección con dicho agente. Tras la detección de las manchas, éstas se correlacionan con las manchas proteicas de geles bidimensionales teñidos, realizados en paralelo con los mismos extractos proteicos que los utilizados para la transferencia. Estas manchas se escinden del gel y se identifican mediante

espectrometría de masas identificándose así las proteínas inmunogénicas.

Esta tecnología se usa para el estudio de la respuesta serológica de manera global e integrada y para la identificación de antígenos y, de esta manera, descubrir potenciales biomarcadores de enfermedades infecciosas, así como para buscar estrategias terapéuticas o vacunales. Como ejemplo pueden citarse estudios del inmunoma de *C. albicans* realizados tanto con sueros de ratón como de pacientes que habían sufrido candidiasis invasivas, que han permitido identificar marcadores con utilidad para el diagnóstico y pronóstico de estas infecciones, así como proteínas inmunogénicas aplicables al futuro desarrollo de vacunas frente a *C. albicans* (Pitarch y col., 1999; Pitarch y col., 2001; Fernández-Arenas y col., 2004; Pitarch y col., 2004; Pitarch y col., 2006; Martínez-López y col., 2008; Pitarch y col., 2011).

5.3. Análisis de subproteomas.

Existe una gran dificultad técnica en la identificación y caracterización de proteínas cuando se analizan muestras complejas como las células eucariotas. Para facilitar este análisis se han desarrollado técnicas para el aislamiento de subproteomas (por ejemplo, de los orgánulos celulares) y de proteínas con similares características químicas. Los subproteomas deben contener la mínima contaminación posible de otros subproteomas u orgánulos, preservar cualquier modificación post-traducciona inducida durante el proceso biológico y ser reproducibles (Guo y col. 2007).

En el estudio de las levaduras, uno de los subproteomas que tiene interés analizar es el correspondiente a la pared celular. Existen distintas posibilidades de obtener este subproteoma, por ejemplo, a partir de paredes aisladas tras rotura celular tratadas con diferentes reactivos químicos o enzimáticos para liberar las proteínas. Otra estrategia, muy útil cuando se desean analizar las proteínas más superficiales de esta estructura, está basada en la obtención del denominado "surfoma". Esto se realiza mediante la digestión directa con tripsina de las proteínas localizadas en la superficie de células vivas, seguido de un análisis de los péptidos obtenidos mediante una separación cromatográfica e identificación por espectrometría de masas mediante fragmentación (figura 10). Se debe controlar la viabilidad de las células antes y después de la digestión para asegurar la mínima contaminación con proteínas citoplasmáticas. Esta estrategia que se ha descrito para la caracterización e identificación de las proteínas de la superficie celular de *Streptococcus* como posibles candidatos en el desarrollo de vacunas (Rodríguez-Ortega y col., 2006) así como de las levaduras *C. albicans* y *S. cerevisiae*,

permitiendo identificar un alto número de proteínas presentes en su pared celular (Martínez-López y col., 2008; Hernáez y col., 2010; Insenser y col., 2010).

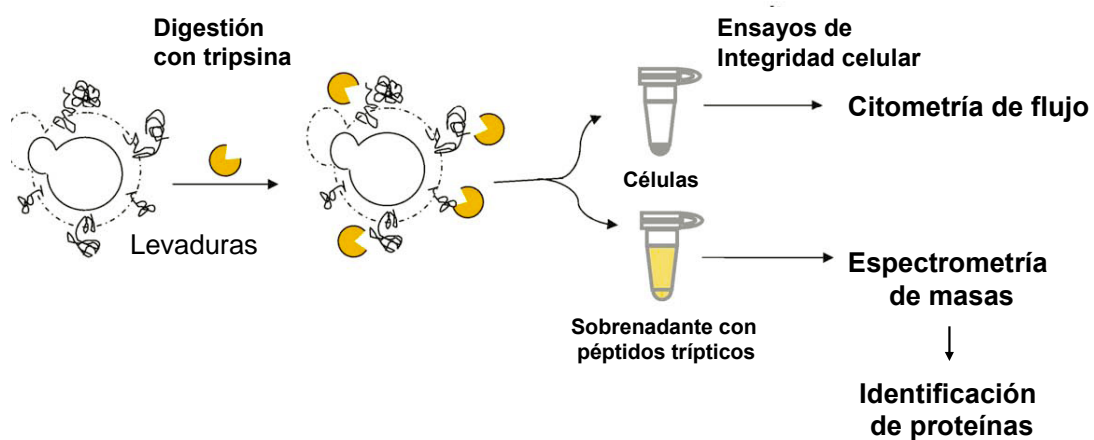
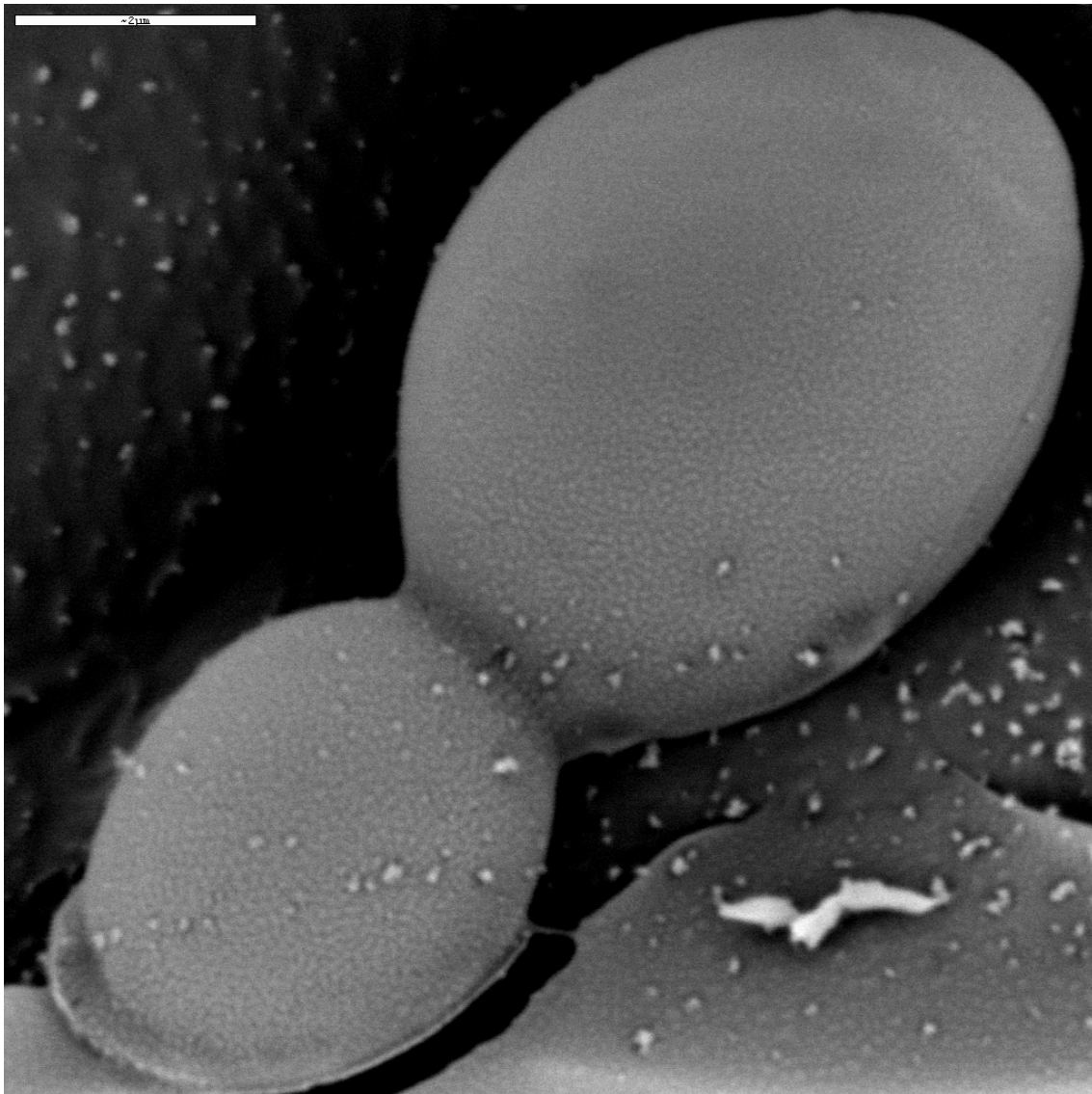


Figura 10. Esquema del análisis proteómico del surfoma de levaduras. Modificado de Hernáez y col. (2010).



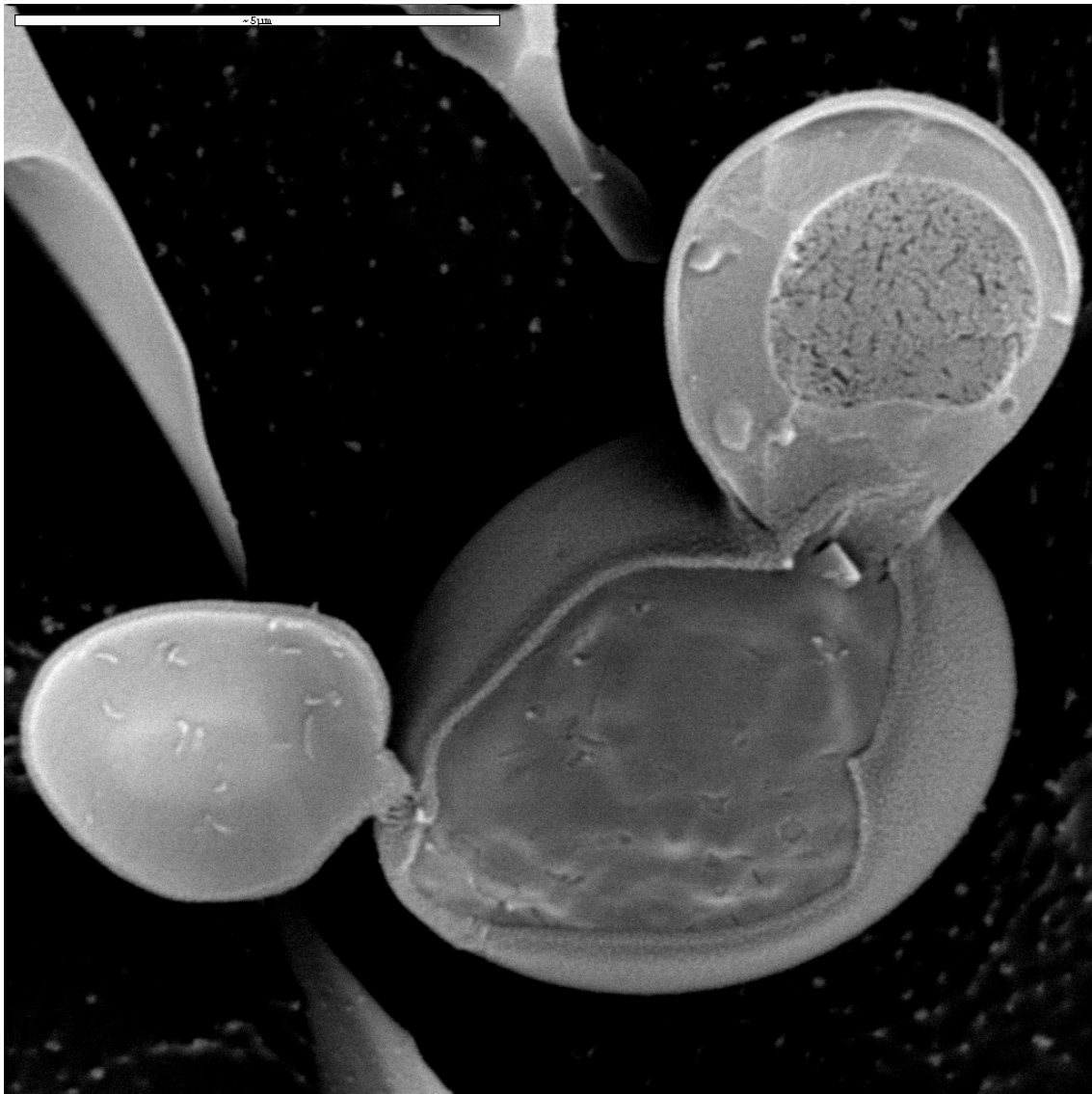
ANTECEDENTES

En estudios previos realizado por el grupo de investigación de la Dra. Amparo Querol y la Dra. M^a Teresa Fernández-Espinar del IATA (Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos) de Valencia se observó que aislados clínicos de *S. cerevisiae* a partir de muestras de sangre en dos casos de fungemia mostraron un patrón molecular asociado al de cepas comerciales de panadería y del agente probiótico *S. cerevisiae* var. *boulardii* (de Llanos y col., 2004). Estas cepas comerciales mostraron rasgos fenotípicos asociados a la patogenicidad (de Llanos y col., 2006) y su virulencia en sistemas murinos de infección sistémica fue comparable a la de aislados clínicos de infecciones genitales y respiratorias (de Llanos y col., 2011).

Para estudiar la posible virulencia de un mayor número de cepas, se analizaron posteriormente 23 productos comerciales (productos dietéticos y probióticos) que supuestamente contenían células de *S. cerevisiae* en su formulación. Sólo en 9 productos se aislaron levaduras. Los aislados D2, D3, D4, D5, D7, D8 y D14 se identificaron como *S. cerevisiae*, mientras que el aislado D6 se identificó como un híbrido entre las especies *S. kudriavzevii* y *S. cerevisiae* y el aislado D23 como un híbrido entre *S. bayanus* y *S. cerevisiae*. Mediante análisis de restricción del DNA mitocondrial y la amplificación por PCR de elementos delta, se determinó que los aislados D2, D5, D6, D14 y D23 presentaban un perfil molecular único, mientras que los aislados D3, D4, D7 y D8 constituían un grupo con el mismo perfil molecular del cual se eligió al azar el aislado D4 como representante del grupo. (Llopis, 2012).

Entre los rasgos asociados a virulencia, se estudió la capacidad de pseudofilamentación, el crecimiento invasivo y la secreción de enzimas hidrolíticas de las cepas anteriormente mencionadas. Las cepas D2, D4, D5 y D14 fueron las que mostraron más positividad en estos ensayos fenotípicos, mientras que las cepas híbridas D6 y D23 fueron las que presentaron menos rasgos asociados a virulencia (Llopis, 2012).

Se realizaron estudios de patogenicidad en modelo murino, por inyección en la vena lateral de la cola utilizando ratones BALB/c (inmunocompetentes), con las cepas D2, D4 y D14 que se seleccionaron por presentar rasgos de virulencia y la cepa D23 que no los presentaba. Además, se incluyeron como controles negativos las cepas 10431 (levadura vínica de baja virulencia) y la cepa de laboratorio W303. Se obtuvo un 27,5% de muerte de ratones inoculados con la cepa D14 y un alto alojamiento en cerebro y riñón en el caso de las cepas D2, D4 y D14 (Llopis, 2012). Además, se ha descrito que la cepa D5 obtenida a partir del probiótico Ultralevura[®] muestra una patogenicidad en modelo murino similar a la de cepas clínicas (de Llanos y col., 2011).



OBJETIVOS

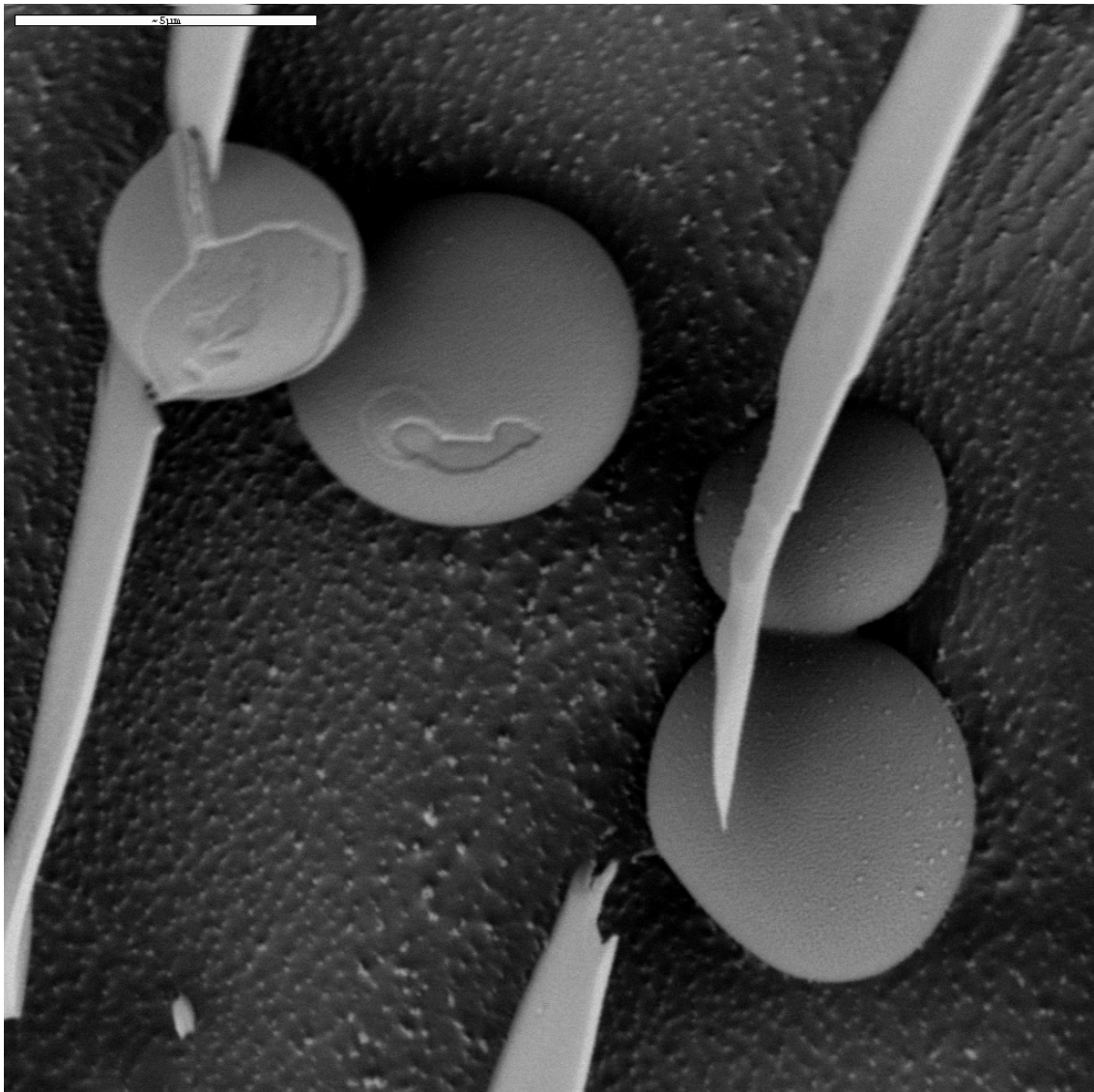
1. Estudio de rasgos asociados a la virulencia de las cepas de *S. cerevisiae* D2, D4, D5, D6, D14 y D23 aisladas de suplementos dietéticos y probióticos:

- Crecimiento a diferentes temperaturas.
- Fenómeno de *switching*.
- Activación de rutas de MAPKs y morfología celular.
- Adherencia a plástico.

2. Análisis de la respuesta serológica a la infección sistémica por *S. cerevisiae* D14 (aislada de suplementos dietéticos) y W303 (cepa de laboratorio) mediante inmunoproteómica.

3. Análisis proteómico de expresión diferencial de proteínas mediante 2D-DIGE de las cepas de *S. cerevisiae* D14 y W303 tras su incubación con sangre.

4. Análisis proteómico del surfoma de la cepa D14 de *S. cerevisiae* en presencia de suero.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas microbianas.

Para la realización de este trabajo se han utilizado 6 cepas de *Saccharomyces* aisladas de suplementos dietéticos, alimentos enriquecidos y probióticos (D2, D4, D5, D6, D14 y D23) aisladas por el grupo de la Dra. Amparo Querol y la Dra. M^a Teresa Fernández-Espinar (tabla 1). Cuatro de ellas (D2, D4, D5 y D14) son cepas de *S. cerevisiae* y las otras dos son híbridos interespecíficos, la D6 es un híbrido entre *S. kudriavzevii* y *S. cerevisiae* y la D23 entre *S. bayanus* y *S. cerevisiae* (Llopis, 2012).

Tabla 1. Lista de los productos a partir de los cuales se han aislado las levaduras.

Designacion	Nombre Comercial	Presentacion	Casa Comercial
D2	Levivel	Comprimidos	NOVA DIET, S.A.
D4	Levadura A+E	Comprimidos	ALTANA PHARMA, S.A.
D5	Ultralevura®	Comprimidos	UPSAMÉDICA, S.L.
D6	Levadura de cerveza Ferrán	Líquida	INSTITUTO FERRÁN
D14	Phytodepur	Comprimidos	INTERSA, S.A.
D23	Cerveza PILS	Líquida	RAPUNZEL

También se han utilizado las cepas de laboratorio: *S. cerevisiae* BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) (EUROSCARF) y *S. cerevisiae* W303 (*MATa; ura3-52; trp1D2; leu2-3_112; his3-11; ade2-1; can1-100*) (Thomas y Rothstein, 1989) y la cepa 10431 de *S. cerevisiae* aislada de vino proporcionada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Los aislados clínicos utilizados en este trabajo fueron: *C. albicans* SC5314 (Gillum y col., 1984) y *S. cerevisiae* 102 procedente de fluido pleural de un paciente del hospital Vall d' Hebrón de Barcelona (de Llanos y col., 2004) cedido por el grupo de la Dra. Amparo Querol y la Dra. M^a Teresa Fernández-Espinar.

2. Medios y condiciones de cultivo.

Los medios empleados para el crecimiento de levaduras fueron:

- YPD: 2% glucosa (Panreac); 2% peptona (Pronadisa); 1% extracto de levadura (Pronadisa).
- Medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies).
- Solución glucosalina: 3,6% glucosa; 0,3% cloruro sódico (Panreac).
- Medio sintético: 2% glucosa; 0,5% sulfato amónico (Panreac); 0,17% base nitrogenada sin aminoácidos (Pronadisa); 0,192% mezcla de aminoácidos sin

uracilo (Formedium); 0,01% uracilo (Sigma).

Los medios sintético y YPD así como la solución glucosalina se prepararon y esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Al medio YPD sólido se le añadió un 2% de agar.

Al medio YPD se le añadieron diferentes compuestos para realizar ciertas pruebas fenotípicas:

- YPD con phloxina B: se añadió 0,005 ‰ phloxina B (Sigma).
- YPD con KCl: se añadió KCl (Merck) a diferentes concentraciones (1, 1.2 y 1.5 M).
- YPD con NaCl: se añadió NaCl (Panreac) a diferentes concentraciones (0.5 y 1 M).
- YPD con sorbitol: se añadió sorbitol (Panreac) a diferentes concentraciones (1, 1.5 y 2 M).
- YPD con diamida: se añadió diamida (Sigma) a diferentes concentraciones (3, 4 y 5 mM).
- YPD con menadiona: se añadió menadiona (Sigma) a diferentes concentraciones (0.1, 0.15 y 0.2 mM).
- YPD con H₂O₂: se añadió H₂O₂ (Panreac) a diferentes concentraciones (8, 9 y 10 mM).

Los medios de YPD con KCl, NaCl y sorbitol se prepararon esterilizándolos en autoclave a 121° C durante 20 minutos mientras que los medios con phloxina B, diamida, menadiona y H₂O₂ se prepararon esterilizando el medio YPD en autoclave a 121° C durante 20 minutos, enfriándolo a 50°C y añadiéndole los diferentes compuestos.

El crecimiento de las levaduras se realizó mediante siembra en placas de YPD e incubación en estufa a 30°C a partir de las cepas conservadas en viales con glicerol al 25% a -80°C. A partir de colonias aisladas de estas placas se sembraron los medios líquidos.

3. Determinación del crecimiento.

3.1. Turbidimetría.

El crecimiento de las distintas cepas en medio líquido se determinó midiendo la turbidez de los mismos mediante la lectura de la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640.

3.2. Recuento de células.

El número de levaduras de los cultivo se determinó mediante recuento de células en cámara de Neubauer con un microscopio de contraste de fases. Siendo significativo el recuento cuando el número de células contadas por cuadrante se encontraba entre 30 y 300 células.

3.3. Crecimiento en placa.

Para realizar los ensayos de sensibilidad a diferentes compuestos y temperaturas, se determinó el crecimiento de las cepas en diferentes medios sólidos. Se sembraron las cepas en medio YPD líquido incubándose toda la noche a 30°C en agitación (200 rpm). Al día siguiente, con esta suspensión se sembraron en 10 ml de YPD a una absorbancia de 0,3 y se mantuvieron durante 3 horas a 30°C en agitación (200 rpm) para obtener células en fase exponencial. Se ajustó la absorbancia de los cultivos a 0,5 (correspondiente a 5×10^6 células/ml) y se realizaron 3 diluciones decimales seriadas. Se depositaron 5 μ l de cada suspensión de levadura en placas con los diferentes medios y se incubaron a 30°C durante 30 h. En el caso de la determinación de crecimiento a diferentes temperaturas las placas se incubaron a 30, 37, 39 y 42°C durante 30 h. Como control de crecimiento se utilizaron las cepas crecidas en medio YPD incubadas a 30°C.

También se determinó el crecimiento de las cepas tras incubarlas con H_2O_2 , para ello las suspensiones de levaduras (5×10^6 células/ml) se sometieron a 100 mM de H_2O_2 durante una hora y se depositaron 5 μ l en las placas de YPD a los tiempos estudiados (0, 2, 5, 10, 15, 30, 45 y 60 min).

3.4. Determinación del tiempo de generación.

Se realizaron preinóculos de las distintas cepas a ensayar en YPD líquido que se incubaron toda la noche a 30°C en agitación (200 rpm). Al día siguiente, con esta suspensión se sembraron 20 ml de YPD a una absorbancia de 0,1 y se incubaron durante 8 horas a 30°C y a 37°C en agitación (200 rpm) para tener crecimiento de las células en fase exponencial. La absorbancia de los cultivos fue midiéndose cada hora a partir de las 2 h. Se calculó el tiempo de generación de cada levadura mediante la ecuación de la recta del crecimiento, comprobándose en todas ellas un coeficiente de regresión R^2 mayor de 0.95. A partir de la pendiente de la recta (μ), cuyo valor representa la tasa específica de crecimiento, se obtuvo el tiempo de

generación (tg) mediante la ecuación: $tg = \ln(2/\mu)$.

Se realizó el test estadístico *t-Test* a los datos obtenidos de las diferentes cepas frente a las cepas de laboratorio considerando un resultado estadísticamente significativo si el *p-value* era menor de 0.05.

4. Valoración de la pérdida de permeabilidad selectiva mediante yoduro de propidio.

Las muestras con aproximadamente 1×10^6 células en 1 ml de tampón fosfato salino (PBS) se marcaron con yoduro de propidio (IP) al 0,005%. El IP es un fluorocromo que tiñe específicamente los ácidos nucleicos de la levadura (de la Fuente y col., 1992). Cuando se ha producido pérdida de permeabilidad de la membrana, las levaduras incorporan el colorante, emitiendo fluorescencia al ser irradiadas. Las células teñidas se analizaron con el citómetro de flujo *Guava easyCyte 8HT Base System* (Merck Millipore) determinándose el porcentaje de células positivas para el IP en la población que se está analizando (Insenser y col., 2010). Este citómetro está equipado con un láser capaz de emitir luz a longitud de onda de 488 nm que excita al IP el cual emite fluorescencia a 617 nm. Como control positivo de pérdida de permeabilidad selectiva se utilizaron células tratadas con etanol puro.

5. Adhesión celular a plásticos.

5.1. Adhesión a placa Petri.

Para realizar estos experimentos se inocularon cada una de las cepas a ensayar en medio YPD líquido incubándose toda la noche a 30°C en agitación (200 rpm). A partir de estos cultivos se prepararon suspensiones con 10^6 células/ml en solución glucosalina.

En este estudio se utilizaron placas Petri de poliestireno en las cuales se añadieron 10 ml de cada suspensión (10^6 células/ml) y tubos de cristal en los que se añadieron otros 10 ml como control negativo ya que las levaduras no se adhieren al vidrio. Se incubaron las placas y los tubos durante 1 hora a 37°C con atmósfera del 5% de CO₂. Tras la incubación de las placas y tubos, se recogió el contenido de los mismos usando pipeta y sin tocar el fondo de las placas para no despegar las células que pudieran estar adheridas. Se hicieron 2 lavados con 5 ml de agua estéril y se recogieron y mezclaron con la solución anterior. Se realizó el

recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de YPD, tanto de las soluciones recogidas de las placas Petri como de las soluciones recogidas de los tubos de vidrio. La diferencia entre ambos recuentos se consideró como el número de células adheridas al plástico. Se realizaron entre 4 y 5 réplicas biológicas.

5.2. Adhesión a placa multipocillo.

Se utilizó el método de adhesión a placa multipocillo mediante tinción con cristal de violeta descrito por Peeters y col. (2008).

Para determinar la concentración óptima de levaduras a la que se obtienen unos rangos cuantificables de absorbancia se realizó un primer ensayo en el que se incluyeron diferentes concentraciones de levaduras determinándose como óptima una concentración de 10^8 células/ml.

Para realizar los experimentos se inocularon cada uno de los aislados a ensayar en medio YPD líquido incubándose toda la noche a 30°C en agitación (200 rpm). A partir de estos cultivos se prepararon suspensiones con 10^8 células/ml de cada una de las cepas en solución glucosalina.

En este estudio se utilizaron placas multipocillo de poliestireno (96 pocillos) (Greiner Bio-One) en las cuales se añadieron 100 μ l de cada suspensión (10^8 células/ml) en 16 pocillos por cepa. Como control negativo o blanco se usaron 16 pocillos con solución glucosalina sin inocular. Las placas multipocillo se incubaron durante 1 hora a 37°C con atmósfera del 5% de CO₂, tras lo cual se eliminó el sobrenadante de las placas y se lavó cada pocillo con solución glucosalina, a continuación se fijaron las células adheridas al plástico durante 15 minutos con 100 μ l de metanol al 99%. Se eliminó el metanol y se añadieron 100 μ l de solución de cristal de violeta (0,2% cristal de violeta) para la tinción de las células dejándose actuar durante 20 minutos. Una vez teñidas las células, se lavó el exceso de colorante con agua y se añadieron 150 μ l de una solución de ácido acético (33% ácido acético) a cada pocillo para disolver el colorante de las células. Para concluir se midió la absorbancia de cada pocillo a 590 nm en un *Microplate Reader model* 680 (Bio-Rad). Se realizaron entre 4 y 5 réplicas biológicas.

5.3. Adhesión a catéteres.

Para realizar el estudio de adhesión a catéteres se ha puesto a punto el siguiente método:

Para determinar la concentración óptima de levaduras a la que se obtienen unos rangos cuantificables de adhesión se realizó un primer ensayo en el que se

incluyeron diferentes concentraciones de levaduras determinándose como óptima una concentración de 10^7 células/ml.

En la puesta a punto de este método, se probaron diferentes formas de incubar los catéteres (en placa de 6 pocillos, en eppendorf, con 5% de CO₂, sin agitación y con agitación suave) y posteriormente de lavarlos para obtener un protocolo en el que se obtuviesen resultados cuantificables y reproducibles.

Cada una de las cepas a ensayar se inoculó en medio YPD sólido incubándose 48 horas a 30°C. A partir de estos cultivos se prepararon suspensiones con 10^7 células/ml en solución glucosalina y RPMI. Los catéteres utilizados fueron *multi-lumen central venous catheterization set with Blue FlexTip*® (CV-15703, Arrow Internacional) (figura 11).

Se añadió 1 ml de cada suspensión y un fragmento de catéter de 1 cm de longitud previamente cortado a un eppendorf. Los eppendorfs se incubaron a 37°C en agitación suave durante diferentes tiempos: 1 y 24 horas, tras lo cual se extrajo el catéter y se depositó en un nuevo eppendorf donde se realizaron 3 lavados suaves con agua estéril con la ayuda de una bomba de vacío y una pipeta Pasteur para poder extraer la solución de dentro del catéter. Se añadió 1 ml de agua estéril y se agitó utilizando *vortex* durante 5 minutos para despegar las células adheridas a los catéteres. Se sembraron 200 µl de esta suspensión en placas de YPD por triplicado y se incubaron a 30°C durante 48 horas, tras lo cual se realizó el recuento de las UFC. Se realizaron entre 4 y 5 réplicas biológicas.



Figura 11. Foto de los catéteres utilizados en los experimentos. La parte amarilla es la que se inserta en el paciente, por lo que es la parte utilizada en los experimentos.

Se realizó el test estadístico *t-Test* a todos los datos de adhesión a plástico de las cepas comerciales frente a las de laboratorio, considerando un resultado estadísticamente significativo si el *p-value* era menor de 0.05.

6. Variación fenotípica o *switching* colonial.

Para realizar estos experimentos se inocularon cada uno de los aislados a ensayar en medio YPD líquido incubándose toda la noche a 24°C en agitación (200 rpm) y a partir de estos cultivos se prepararon suspensiones con 10^3 células/ml en agua estéril.

Se sembraron 75 placas de YPD con phloxina B con 100 µl de las suspensiones por placa. Se incubaron durante 5 días a 30°C tras lo cual se realizó el recuento de entre 6.000 y 10.000 colonias de los diferentes fenotipos que aparecieron en las placas.

Se estudió la reversibilidad o estabilidad de los fenotipos secundarios más abundantes. Para ello se pusieron cultivos de cada uno de los fenotipos secundarios a ensayar en medio YPD líquido incubándose toda la noche a 24°C en agitación (200 rpm) y se prepararon a partir de estos cultivos suspensiones con 10^3 células/ml en agua estéril. Se sembraron 30 placas de YPD con phloxina B 0,005 ‰ por cada fenotipo secundario con 100 µl de las suspensiones (10^3 células/ml) por placa. Se incubaron durante 5 días a 30°C tras lo cual se realizó el recuento de los diferentes fenotipos que aparecieron en las placas.

7. Interacción de *S. cerevisiae* con sangre.

Para realizar estos experimentos las cepas a ensayar se inocularon en medio YPD líquido incubándose toda la noche a 30°C en agitación (200 rpm). Al día siguiente, con esta suspensión celular se inocularon matraces con 250 ml de RPMI a una absorbancia de 0.3 a 600 nm y se incubaron 3 horas a 37°C en agitación (200 rpm) para que tras su incubación estuvieran en fase exponencial de crecimiento.

La incubación de *S. cerevisiae* con sangre se realizó en una proporción de $5 \cdot 10^7$ células/ml de levaduras en 16 ml de sangre de donantes sanos, para ello, se centrifugaron (3500 rpm, 10 minutos) los volúmenes de cultivo correspondiente a $8 \cdot 10^8$ células. Se eliminaron los sobrenadantes, se resuspendieron las células con 0.5 ml de PBS estéril, se añadieron a 16 ml de sangre humana atemperada a 37°C y se dejaron incubando 0, 1,5 y 3 horas a 37° C con atmósfera del 5% de CO₂. Con estas muestras se realizaron los experimentos de los siguientes apartados 7.1 y 7.2.

7.1. Supervivencia en sangre.

Tras la incubación con sangre, las muestras se homogenizaron mediante agitación en *vortex* y se cogieron muestras a los diferentes tiempos para realizar un recuento. Para ello, se hicieron sucesivas diluciones con agua estéril (proceso que rompió las células sanguíneas) y se sembraron en placas de YPD, donde, tras 48 horas de incubación a 30°C, se procedió al recuento de UFC.

7.2. Obtención de células de *S. cerevisiae* tras su incubación con sangre.

Trascurrido el tiempo de incubación de las células de *S. cerevisiae* con sangre se procedió a la eliminación de las células sanguíneas de la muestra para obtener las levaduras (figura 12). Para ello se añadió agua MilliQ a las muestras hasta 50 ml y se agitaron con *vortex* para romper las células sanguíneas, se centrifugaron las muestras 8 minutos a 4°C y 3500 rpm y se eliminaron los sobrenadantes. Después se resuspendieron las muestras con 2 ml de tampón de Tritón (Tris 50 mM; EDTA 2 mM; Tritón X-100 0.25%, a pH 7,5) dejándolo actuar 30 minutos a 4°C tras lo cual

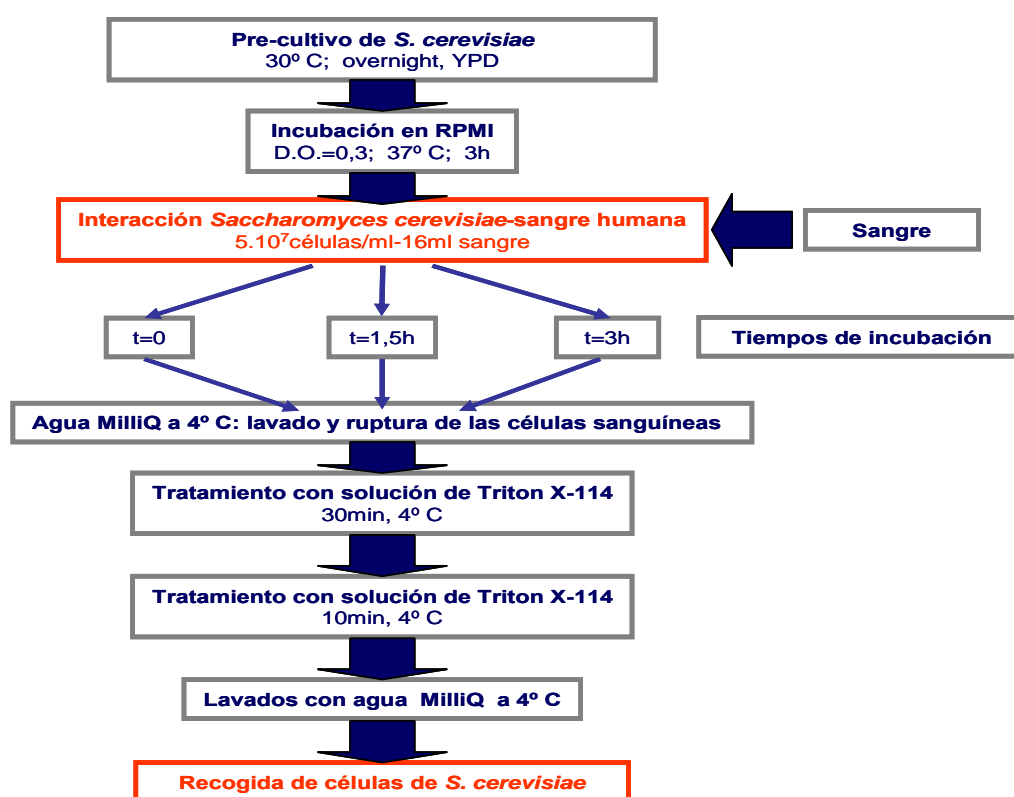


Figura 12. Esquema del experimento de incubación de *S. cerevisiae* con sangre y obtención de las levaduras.

se llevaron a un volumen de 10 ml con agua MilliQ helada; se centrifugaron a 3500 rpm durante 8 minutos a 4°C y se descartaron los sobrenadantes. Se volvió a repetir el tratamiento esta vez con 1 ml con tampón de Tritón y dejándolo actuar 10 minutos y se hicieron 3 lavados con agua MilliQ helada para eliminar los restos de tritón; Para guardar las muestras, tras centrifugación a 3500 rpm durante 8 minutos, las células de *S. cerevisiae* se congelaron a -80°C.

8. Incubación de células de *S. cerevisiae* con suero.

Para realizar estos experimentos se inocularon las cepas a ensayar en medio YPD líquido incubándose toda la noche a 30°C en agitación (200 rpm). Al día siguiente 15 ml de los cultivos a una absorbancia de 1 se lavaron dos veces con PBS estéril y se resuspendieron en medio sintético con un 10% de suero humano tras lo cual se incubaron 3 horas a 37°C en agitación (200 rpm). Se hizo un primer lavado de las células con PBS con Tween-20 0.1% y seis lavados más con PBS, recogiendo las células, tras centrifugación a 3500 rpm durante 8 minutos, para su posterior obtención de péptidos de superficie celular y para el análisis proteómico del surfoma.

9. Microscopia.

Para observar la morfología celular de las diferentes cepas de *S. cerevisiae* se inocularon cada una de las cepas a ensayar en medio YPD líquido incubándose toda la noche a 30°C en agitación (200 rpm). Estos cultivos se examinaron con un microscopio de contraste de fases Nikon Eclipse TE2000-U utilizando el objetivo de 100 aumentos. Las fotografías se realizaron en este microscopio con una cámara Hamamatsu Orca-ER acoplada. El *software* empleado para la captación y procesamiento de las imágenes fue CAPTURE 6.0.

10. Obtención de extractos proteicos de *S. cerevisiae*.

Para la obtención de las células de *S. cerevisiae* se inocularon cada una de las cepas a ensayar (a partir de las placas de YPD sembradas) en medio YPD líquido incubándose toda la noche en agitación (200 rpm) a 24°C (para el caso del estudio de las rutas de MAPKs) o 30°C (para el caso del estudio de inmunoproteómica). Al día siguiente, se sembraron 20 ml de YPD a una absorbancia de 0,3 y se mantuvieron durante 3 horas en agitación (200 rpm) a 24 o 39°C (para el caso del

estudio de las rutas de MAPKs) o a 30°C (para el caso del estudio de inmunoproteómica) para obtener células en fase exponencial.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se vertieron los cultivos en tubos de 50 ml que contenían hielo y se recogieron las células mediante centrifugación a 3000 rpm durante 3 minutos a 4°C, se descartaron los sobrenadantes y las células se resuspendieron en 0.5 ml de agua helada. Estas suspensiones se transfirieron a tubos eppendorf en hielo, se centrifugaron a 13.000 rpm durante 3 segundos y se descartó el sobrenadante. Las muestras se congelaron a -80° C hasta el momento de la ruptura celular.

Para romper las células, éstas se resuspendieron con 150 µl de tampón de lisis a 4°C. Se usaron 3 tampones distintos dependiendo del estudio posterior. Para los estudios de inmunoproteómica el tampón contenía Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 2% y PMSF 1 mM; para los estudios de interacción con sangre contenía Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4%, Tris 10 mM, PMSF 0.5 mM ajustado a pH 8.5; y para el estudio de las rutas de transducción de señales contenía glicerol 10%, Tris HCl 50 mM pH 7.5, Tritón 1%, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, EDTA 5 mM, PMSF 1 mM, los inhibidores de fosfatasa: NaF 50 mM, Pirofosfato sódico 5 mM, β-Glicerofosfato 50 mM y Ortovanadato sódico 1 mM, y una pastilla de inhibidores de proteasas (*Protease inhibitor cocktail tablets*, Roche) en 10 ml de tampón, quedando estos inhibidores de proteasas a la siguiente concentración: TPCK (tosil fenil alanín clorometil cetona) 25 µg/ml, TLCK (tosil lisín clorometil cetona) 25 µg/ml, pepstatina-A 25 µg/ml, antipaina 25 µg/ml, leupeptina 25 µg/ml y aprotinina 25 µg/ml. Se añadieron bolas de vidrio de 1 µm de diámetro hasta el menisco de las suspensiones celulares y se rompieron las células en una Fast Prep (Bio101, Savant) a intensidad 5.5 durante 25 segundos. Se separaron los extractos celulares de las bolas de vidrio recogiendo los sobrenadantes con pipeta, los cuales se clarificaron mediante centrifugación a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes y se congelaron a -80°C.

11. Precipitación de proteínas.

Se realizó la precipitación de proteínas en los extractos celulares para la eliminación de sales y otros compuestos que interferían en la electroforesis.

11.1. Precipitación con TCA-Acetona.

Las muestras para inmunoproteómica se precipitaron añadiendo TCA (ácido tricloroacético) al 15% durante 1 hora agitando cada 10 minutos. Estas muestras

se centrifugaron desechando el sobrenadante y se resuspendieron en acetona dejando la muestra toda la noche a -20°C . Al día siguiente las muestras se centrifugaron descartando el sobrenadante y se resuspendieron con tampón Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4%, Tris 30 mM a pH 8.5 (GE Healthcare, 2004).

11.2. Precipitación con kit comercial 2D Clean-Up.

Para la precipitación de proteínas en las muestras para el estudio proteómico de expresión diferencial 2D-DIGE se usó el kit comercial 2D Clean-Up (GE Healthcare). Las proteínas se resuspendieron en tampón de muestra que contenía: Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4% y Tris 30 mM pH 8.5. Estos extractos proteicos se congelaron a -80°C .

12. Cuantificación de proteínas.

12.1. Método espectrofotométrico.

Para los estudios de fosforilación de proteínas la estimación de la concentración de proteína se llevó a cabo midiendo su absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640. Se consideró que 1 unidad de absorbancia a dicha longitud de onda correspondía aproximadamente a una concentración de 1.5 mg/ml de proteína.

12.2. Método Bradford.

Para determinar la concentración proteica de las muestras para los estudios de inmunoproteómica se utilizó el método Bradford (Bradford, 1976), empleando el reactivo comercial de Bio Rad. Para realizar la recta patrón se utilizó una solución de seroalbúmina bovina (BSA) de concentración conocida y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640.

12.3. Método RC DC de Bio-Rad.

La cantidad de proteína de las muestras a analizar para el estudio proteómico de expresión diferencial 2D-DIGE se determinó utilizando el kit RC DC Protein Assay (RC, *reducing agent compatible* / DC, *detergent compatible*, Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. La recta patrón se realizó con una solución de BSA de concentración conocida y se midió la absorbancia de cada una de las muestras a

750 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640.

13. Electroforesis.

• 1D-PAGE

Para preparar las muestras, se igualaron las concentraciones de los diferentes extractos proteicos y se les añadió un volumen igual de tampón de carga (2x), que contenía Tris HCl 100 mM pH 6.8, SDS 4%, Glicerol 20%, Azul de bromofenol 0.2% y DTT 200 mM. Las muestras se hirvieron durante 10 min a 99°C y se centrifugaron a 13.000 rpm 5 min.

Para la electroforesis 1D-PAGE se utilizó el sistema Mini Protean II (Bio-Rad). Los geles de poliacrilamida al 10% de acrilamida se realizaron siguiendo el sistema descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo a 150 V durante 1 hora. Se cargaron 150 µg de proteína de cada muestra y el patrón de pesos moleculares *BenchMark Prestained Protein Ladder* (Invitrogen). El tampón de electroforesis que se utilizó contenía Tris 25 mM, Glicina 250 mM y SDS 0.1%.

• 2D-PAGE

Primera dimensión:

En el estudio de inmunoproteómica se usaron tiras de gradientes de pH inmovilizados (IPG) de pH entre 3 y 11 no lineal (*Immobiline DryStrip*, 18 cm, GE Healthcare) con las que se realizó la rehidratación en gel, durante entre 10 y 20 horas, con la muestra (350 µg de extracto proteico) más el tampón de rehidratación (Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4%, Anfolitos 2%, DTT 1 M 1%, trazas de azul de bromofenol) hasta un total de 350 µl, cubriéndolas con aceite mineral (*PlusOne™ DryStrip Cover Fluid*, GE Healthcare) en los sarcófagos de rehidratación (GE Healthcare, 2004).

Se colocaron los sarcófagos con las tiras IPG rehidratadas sobre un dispositivo *IPGphor Isoelectric Focusing System* (GE Healthcare) donde se realizó el isoelectroenfoque a una temperatura constante de 15°C utilizando el siguiente programa: 500 V, 3 horas; de 500 a 1000 V en gradiente, 6 horas; de 1000 a 8000 V en gradiente, 3 horas; 8000 V, 12.5 horas; 500 V 2 horas.

Tras el isoelectroenfoque de las tiras de gradiente de pH, éstas se equilibraron dejándolas 12 minutos en agitación suave en solución de equilibrado (Urea 6M, SDS 2%, Glicerol 30%, Tris 0.05M pH 6.5) con DTE 2% y otros 12 minutos en solución de equilibrado con iodoacetamida 2.5% y azul de bromofenol.

Segunda dimensión:

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12.5% de acrilamida, sobre los que se depositaron las tiras de gradiente de pH inmovilizadas equilibradas y se sellaron con una solución de tampón de electroforesis con 0.5% de agarosa fundida. La electroforesis se llevó a cabo en el dispositivo *Ettan DIGE System* con tampón de electroforesis 1x (Tris 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0,1%) en la cubeta inferior y tampón de electroforesis 2x (Tris 50 mM; Glicina 384 mM; SDS 0.2%) en la cubeta superior. La electroforesis se realizó a 1 W/gel durante 1 hora y hasta un máximo de 17 W/gel hasta su finalización.

14. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.**14.1. Tinción con Azul de Coomassie coloidal.**

Para realizar la tinción con Coomassie coloidal los geles se fijaron con solución de fijación (Etanol 50%, Ácido fosfórico 2%) un mínimo de 3 horas, tras lo que se hicieron tres lavados con agua MilliQ de 10 minutos para eliminar la solución de fijación. Los geles se dejaron agitando en una solución de sulfato amónico 17%, ácido fosfórico 3% y metanol 33% durante una hora, tras lo cual se les añadió una solución de 5 ml de Coomassie Blue G-250 6.6% (Bio-Rad) en metanol y se dejó en agitación durante toda la noche, después se destiñeron con sucesivos lavados con agua MilliQ hasta quedar visibles las manchas proteicas.

14.2. Tinción de plata.

Para teñir los geles se usó el Kit de tinción de plata de GE Healthcare (*Silver Staining kit, Protein*). Los geles fueron fijados en una solución de etanol al 30% y ácido acético al 10% durante un mínimo de 1 hora. Después se incubaron en una solución de etanol al 30%, tiosulfato sódico al 5 % y acetato sódico 0.83M durante 30 minutos. Después se lavaron tres veces con agua MilliQ durante 5 minutos y los geles fueron incubados en una solución de nitrato de plata al 0.25% durante 20 minutos. Tras lavarlos dos veces durante un minuto con agua MilliQ, los geles fueron revelados con una solución de carbonato sódico 0.24 M y formaldehído 0.3%, parando la reacción con $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.067 M cuando las manchas proteicas fueron visibles.

15. Transferencia.

Para realizar las transferencias se utilizaron membranas de nitrocelulosa Hybond ECL, (Amersham Biosciences) y tampón de transferencia (Metanol 20%; tampón 10X 10% (Tris 48 mM; Glicina 39 mM; SDS 0.46 g/l) (Towbin y col., 1979). Para los geles 1D-PAGE se utilizó el sistema Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) y se llevó a cabo a 100 V durante 1 hora. Para los geles 2D-PAGE se utilizó el dispositivo Protean II de Bio-Rad y se llevó a cabo a 250 mA durante 3 horas.

Se comprobó la eficacia de la transferencia de las proteínas del gel a la membrana mediante tinción con una solución de rojo de Ponceau (rojo de Ponceau 0.2%, ácido acético 10%) y lavado con PBS.

16. Detección de proteínas mediante *Western blotting*.

La detección de proteínas para los estudios de rutas de MAPKs se realizó mediante *Western blotting* de geles 1D-PAGE y técnicas de fluorescencia. Para ello, se incubaron las membranas con solución bloqueante Odyssey (LI-COR Biosciences) durante 1 hora en agitación. Se eliminó la solución bloqueante y se incubaron las membranas durante toda la noche en agitación con solución bloqueante Odyssey que contenía Tween-20 0.2% y los anticuerpos primarios. Se usaron 2 anticuerpos primarios por membrana: *Anti-Actin Monoclonal* (Clone:C4) de ratón en dilución 1:1.000 y uno de los siguientes: *Phospho P44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)* de conejo (Cell Signaling) en dilución 1:2.000; anti-Slt2 de conejo (Dr. Martín, UCM) en dilución 1:2.000; *Anti-Kss1 polyclonal* de conejo (Santa Cruz Biotechnology) en dilución 1:100.

Se lavaron las membranas de nitrocelulosa, realizando 4 lavados de 5 minutos en agitación con PBS con Tween-20 0.1%. Se incubaron las membranas durante 45 minutos en agitación y oscuridad con solución bloqueante Odyssey que contenía Tween-20 0.2% y los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos con absorción en 680 nm (canal de detección 700) o 780 nm (canal de detección 800). Se usaron 2 anticuerpos secundarios: *goat anti-rabbit IRDye 800* (LI-COR Biosciences) en dilución 1:5000 para la detección de los anticuerpos primarios de conejo y *goat anti-mouse Alexa Fluor 680* (Molecular Probes) en dilución 1:7000 para la detección del anticuerpo primario de ratón. Se lavaron las membranas de nitrocelulosa en oscuridad y con agitación, realizando 4 lavados de 5 minutos con PBS con Tween-20 0.1%, otro de 5 minutos con PBS y otro de 5 minutos con agua MilliQ. Se escanearon las membranas con el *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-

COR Biosciences) y se cuantificó la intensidad de las bandas con el *software Odyssey* versión 2.1 (Athena).

La detección de proteínas en los ensayos de inmunoproteómica se realizó mediante *Western blotting* de geles 2D-PAGE y técnicas de quimioluminiscencia. En primer lugar la membrana de nitrocelulosa, a la cual se habían transferido todas las proteínas, se bloqueó con leche al 5% en TTBS (Tris-HCl 100 mM, pH 7.5, NaCl 50 mM, Tween 0.05%) durante 2 horas. Posteriormente se procedió al lavado de la membrana con TTBS, durante 15 minutos, 3 veces. A continuación se realizó la hibridación con los anticuerpos presentes en los diferentes sueros obtenidos de ratones infectados con *S. cerevisiae* en una dilución 1:100 en TTBS con 1% de leche desnatada en polvo para minimizar las uniones inespecíficas, y se dejó incubando toda la noche en agitación. Posteriormente se procedió al lavado de la membrana con TTBS, durante 30 minutos, 5 veces. Se utilizaron los anticuerpos policlonales IgGs anti-ratón conjugado con peroxidasa (GE Healthcare) en una dilución 1:2000 disuelto en las mismas soluciones que el anticuerpo primario y se dejó incubando 2 horas en agitación. Se procedió al lavado de la membrana con TTBS, durante 30 minutos, 5 veces, después un lavado con TBS (Tris-HCl 100 mM, pH 7.5, NaCl 50 mM) y por último uno con agua MilliQ. Las manchas proteicas reactivas fueron detectadas utilizando un sistema de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Bioscience) y films BioMax MR1 (Kodak). Estas manchas reactivas se correlacionaron con un gel realizado en paralelo y teñido con coomasie coloidal para su posterior identificación mediante espectrometría de masas. Las membranas pueden reutilizarse hasta dos veces, para ello es necesario deshibridarlas con un tampón de *stripping* (7.5 g/l de glicina (Panreac), pH 2.2, 5 ml de SDS 10%, 5 ml de NP40 al 10%, hasta un volumen final de 1 l con agua MilliQ), durante 30 minutos en agitación. Se procedió al lavado de la membrana con TTBS, durante 30 minutos, 5 veces.

17. 2D-DIGE.

Con los extractos proteicos obtenidos tras la interacción con sangre se realizó un análisis de expresión diferencial mediante la tecnología 2D-DIGE (GE Healthcare, 2005; Unlü y col., 1997; Tonge y col., 2001; Monteoliva y col., 2011).

17.1. Preparación de las muestras.

Las muestras se prepararon ajustando el pH a 8.5, para ello se usaron tiras indicadoras de pH (Sigma) y soluciones de NaOH 1 N y 0.1 N para modificarlo.

Se obtuvieron 3 réplicas biológicas de cada una de las diferentes condiciones a estudiar. Se marcaron las muestras a comparar en cada gel con los fluorocromos Cy3 y Cy5, y el Cy2 se utilizó para marcar un estándar interno, que se incluyó en todos los geles, obtenido mezclando la misma cantidad de proteína de cada una de las muestras que formaban parte del experimento. Las 3 réplicas biológicas de cada condición se distribuyeron en los geles de forma aleatoria para poder obtener resultados comparativos estadísticamente significativos.

17.2. Marcaje con fluorocromos.

Para el marcaje de las muestras se siguieron las instrucciones del kit de marcaje mínimo *CyDye DIGE Fluor minimal dyes* (GE Healthcare) según las instrucciones del fabricante (figura 13). Se usó una proporción de 50 µg de proteína: 400 pmol de fluorocromo (*CyDye DIGE Fluor minimal dyes*, GE Healthcare), y se dejó actuar 30 minutos en hielo y en oscuridad donde los fluorocromos se unen a un 1-2% de las lisinas de las proteínas; tras este tiempo se añadió 1 µl de lisina 10 mM para parar la reacción y se dejó 15 minutos en hielo y en oscuridad.

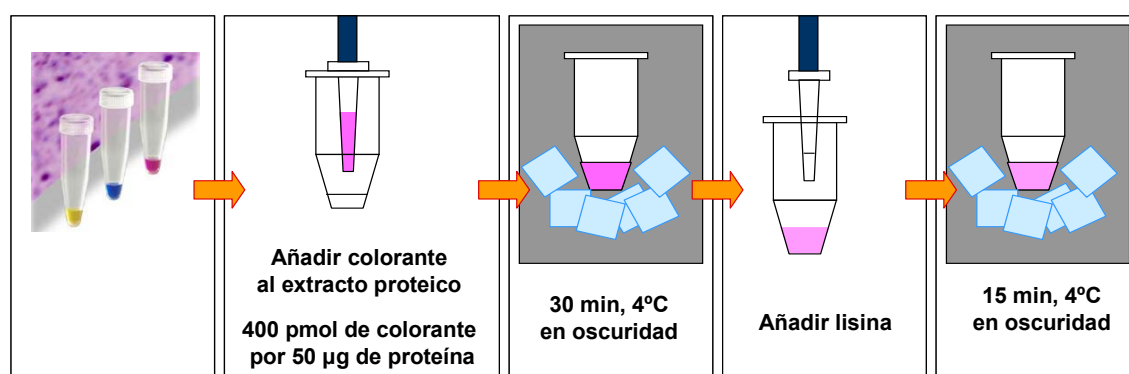


Figura 13. Marcaje de las muestras con fluorocromos.

17.3. Electroforesis bidimensional para el estudio de expresión diferencial 2D-DIGE.

Una vez marcadas las muestras se mezclaron 40 µg de cada una de las muestras de cada gel, una marcada con Cy3, otra con Cy5, y el estándar interno marcado con Cy2, tras lo cual se separaron las proteínas de la mezcla mediante electroforesis 2D-PAGE.

Las condiciones específicas de esta electroforesis bidimensional y que difieren de las del apartado 14 se especifican a continuación. En primer lugar, las tiras de gradientes de pH se rehidrataron sin la muestra, con 350 µl de tampón de

rehidratación (Urea 7 M; Tiourea 2 M; CHAPS 4%; Anfolitos 1%; De Streak 1.2%; trazas de azul de bromofenol) entre 10 y 20 horas cubriéndolas con aceite mineral en la bandeja de rehidratación (*Immobiline DryStrip Reswelling Tray*, GE Healthcare) (Bjellqvist y col., 1993). En segundo lugar, las muestras se cargaron mediante pocillo, para ello a las muestras se les añadió tampón de carga 2x hasta un volumen final de 80 μ l. Este tampón contenía: Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4%, Anfolitos 1%, DTE 1% y trazas de azul de bromofenol, se dejó actuar 10 minutos y tras centrifugar las muestras estas se cargaron en las tiras de gradiente de pH rehidratadas. En tercer lugar, el programa del isoelectroenfoque fue el siguiente: 300 V, 3 horas; de 300 V a 1000 V en gradiente, 6 horas; de 1000 V a 8000 V en gradiente, 3 horas; 8000 V, 5 horas; 500 V, 2 horas. Tras el isoelectroenfoque las tiras de punto isoelectroico se equilibraron y se desarrolló la segunda dimensión como se describe en el apartado 14 de Materiales y Métodos.

17.4. Escaneado de los geles.

Los geles 2D-DIGE se visualizaron en un escáner Typhoon 9400TM (GE Healthcare) con los filtros CyDye. Para la adquisición de las imágenes donde se ven los distintos fluorocromos Cy3, Cy5 y Cy2 se utilizaron las longitudes de onda de excitación/emisión 532 nm/580 nm, 633 nm/670 nm y 480 nm/520 nm, respectivamente, y un tamaño de píxel de 100 μ m. Para recortar las imágenes y seleccionar el área de interés se utilizó el programa ImageQuant TL.

17.5. Análisis de imagen.

El programa DeCyder (GE Healthcare) se utilizó para realizar un análisis estadístico de los geles bidimensionales obtenidos mediante el sistema DIGE, a través de los siguientes módulos:

- DIA (*Differential In gel Analysis*): las manchas proteicas son detectadas y cuantificadas en la serie de imágenes de un mismo gel bidimensional (imagen del estándar interno e imágenes de las muestras experimentales). Como característica del programa se incluye la eliminación del fondo, la normalización de las señales correspondientes a la relación Cy3/Cy5 con la señal del estándar interno Cy2, y la eliminación de cualquier artefacto presente en el gel.
- BVA (*Biological Variation Analysis*): se emparejan las múltiples imágenes de los diferentes geles bidimensionales para proporcionar datos estadísticos de los niveles de abundancia proteica relativos. Las imágenes son emparejadas con una única imagen master (imagen que consideramos como referencia), identificando manchas

proteicas comunes entre los geles. Las condiciones para establecer una proteína como diferencial fueron que estuviera presente en el 75% de los geles procesados, que tuviera una variación de la abundancia de ± 1.3 y un *t-Test* menor de 0.05 o un 2-ANOVA menor de 0.05.

- EDA (*Extended Data Analysis*): se realizan análisis estadísticos avanzados multivariantes que permiten el análisis combinado de diferentes conjuntos de datos. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) utilizando un método no lineal e iterativo de mínimos cuadrados parciales.

18. Obtención de péptidos de la superficie celular.

La obtención de péptidos procedentes de las proteínas de la superficie celular de *S. cerevisiae* se realizó mediante digestión con tripsina sobre células (Hernández y col., 2010; Insenser y col., 2010). Para ello se resuspendieron las levaduras en 0.8 ml de bicarbonato amónico (NH_4HCO_3) 25 mM pH 8 y se incubaron durante 30 minutos a 37°C y 600 rpm con 7.5 μl de ditiotreitól (DTT) 1 M y 10 μl de tripsina recombinante (*trypsin rec. Proteomics grade. Roche Diagnostics GmbH*). Después de la incubación, se centrifugaron las células 3 min a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante, en el que se encuentran los péptidos liberados, que se filtró a través de un filtro con tamaño de poro de 22 μm (Millipore). El sedimento se resuspendió en 400 μl de bicarbonato amónico 25 mM pH 8 y se le añadió 100 μl de ácido trifluoroacético (TFA) 0.1%, con el objetivo de parar la reacción. Se volvió a centrifugar, filtrando nuevamente el sobrenadante y uniéndolo al anterior. La muestra se concentró en una bomba de vacío *speed-vac*, hasta obtenerse un volumen de muestra de alrededor de 2 μl , el cual se mezcló con 10 μl de TFA 0.1%.

La eliminación de sales en la muestra se realizó mediante cromatografía de fase reversa en microcolumna R2 (Applied Biosystems), previamente acondicionada con acetonitrilo al 80% y equilibrada con TFA al 0.5%. Tras aplicar la muestra, se lavó la columna 3 veces con TFA al 0.1% y se procedió a eluir los péptidos con 50 μl de acetonitrilo 80%; después se concentró la muestra utilizando de una bomba de vacío *speed-vac*. Estas operaciones se realizaron en la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid y el Parque Científico de Madrid (PCM-UCM).

19. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.

19.1. MALDI-TOF/TOF.

Para la identificación de manchas proteicas procedentes de los geles bidimensionales teñidos con Coomassie, estas fueron cortadas manualmente con puntas de pipetas recortadas y transferidas a una placa multipocillo con 50 μ l de agua MilliQ para su posterior digestión e identificación en la Unidad de Proteómica de PCM-UCM.

Las proteínas fueron reducidas, alquiladas y digeridas con tripsina (Roche), de acuerdo con el procedimiento publicado por Sechi y Chait (1998). Se colocó 1 μ l de la muestra digerida en una placa de MALDI y se dejó secar al aire durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadió 0.4 ml de matriz por pocillo [3 mg/ml CHCA (Sigma-Aldrich) diluido en 0.1% TFA-ACN/ H₂O (1:1 v/v)] y se dejó secar al aire otros 5 minutos a temperatura ambiente.

La identificación se realizó mediante huella peptídica o mediante fragmentación de péptidos utilizando un espectrómetro de masas de tipo MALDI-TOF/TOF (*MALDI-tandem time-of-flight mass spectrometer 4800 Proteomics Analyzer*, AB Sciex). Como calibrantes internos se emplearon los péptidos de autodigestión de la tripsina.

Las identificaciones de proteínas se llevaron a cabo utilizando como motor de búsqueda MASCOT (MatrixScience; <http://www.matrixscience.com>) y para los estudios de inmunoproteómica se utilizaron como bases de datos: Swiss-Prot 57,15 (<http://www.uniprot.org/>) que contiene 6973 secuencias (para la identificación de las proteínas de *S. cerevisiae*) y CGD 21 (<http://www.candidagenome.org/>) que contiene 6107 secuencias (para la identificación de las proteínas de *C. albicans*). En el caso del estudio proteómico de expresión diferencial se usaron como bases de datos la SGD 09 (<http://www.yeastgenome.org/>) que contiene 6719 secuencias y UniProtKB-SwissProt sprot_160909 (<http://www.uniprot.org/>) que contiene 497293 secuencias. Los parámetros de búsqueda para las huellas peptídicas fueron: derivados de S-carboamidometilo y metioninas oxidadas como modificaciones fijas y variables; se permitió que un sitio de digestión triptica no fuese digerido por esta enzima; tolerancia del precursor 50 ppm; carga peptídica 1.

Se recurrió a la combinación de huella peptídica y fragmentación de péptidos en los casos en los que la huella peptídica no conducía a una identificación clara de la proteína y los parámetros de la búsqueda fueron los mismos excepto la tolerancia del precursor que fue 80 ppm y la tolerancia de los iones fragmentados 0.3 Da.

19.2. LTQ (linear trap quadrupole).

Las muestras que contenían mezcla de péptidos digeridos con tripsina procedentes del surfoma de *S. cerevisiae* fueron analizadas en la Unidad de Proteómica del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB). La separación e identificación de péptidos se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) de fase reversa acoplada a una trampa de iones lineal con ionización por *electrospray LTQ Orbitrap Velos Mass Spectrometer* (Thermo Scientific).

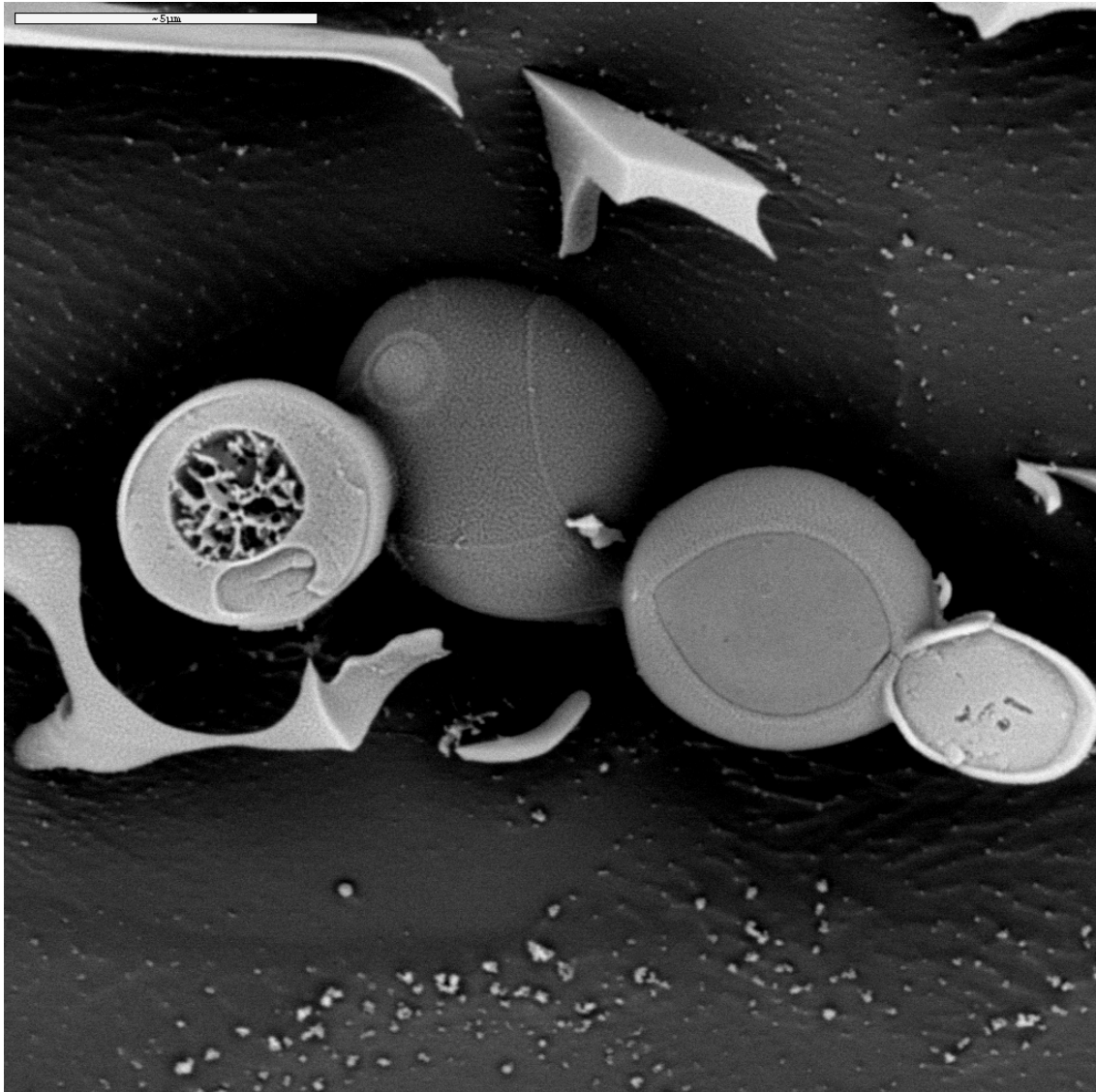
Los péptidos se cargaron en una pre-columna *C18-A1 ASY-Column* de 2 cm (Thermo Scientific) y después se eluyó en una columna *Biosphere C18 column* (diámetro interno de 75 μm , 15 cm de largo, tamaño de partícula de 3 μm) (NanoSeparations) y se separaron usando un gradiente de 140 minutos (110 minutos de 0 a 40% de tampón B, Tampón A: 0,1% de ácido fórmico/2% de ACN; tampón B: 0,1% de ácido fórmico en ACN) a una velocidad de flujo de 250 nl/min en un HPLC nanoEasy (Proxeon) acoplado a una fuente de iones de nanoelectrospray (Proxeon). Los espectros de masas se adquirieron en un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Velos (ThermoScientific) en el modo de iones positivos. La exploración completa de espectros de MS (m/z 400 hasta 1400) se realizó en la orbitrap con un valor objetivo de 1.000.000 (resolución de 60.000 , m/z 400) y los 15 iones más intensos se seleccionaron para disociación inducida por colisión (CID) fragmentándolos en el LTQ con un valor objetivo de 10.000 y energía de colisión normalizada del 38%. Se realizó el cribado del estado de carga del ion precursor y la selección del precursor monoisotópico. Los iones con una sola carga y sin carga asignada fueron rechazados. Se usó una lista de exclusión dinámica (30 s, tamaño de lista de exclusión de 450). Se consideraron proteínas identificadas aquellas cuyos péptidos superaban los siguientes parámetros: probabilidad de péptido de 10^{-3} , XCorr de 2.0 (+2), 2.5 (+3). Los valores calculados para los FDR se encontraban entre 0.4 y 1.2%. Cada muestra se ionizó 2 veces.

Las identificaciones de proteínas se realizaron en la Unidad de Proteómica de PCM-UCM, se llevaron a cabo utilizando como motor de búsqueda MASCOT (MatrixScience; <http://www.matrixscience.com>) en una base de datos no redundante que contenía entradas de SwissProt, usándose como organismo de referencia tanto *S. cerevisiae* como *Homo sapiens* y se utilizaron los péptidos detectados en las dos ionizaciones. Finalmente, se tuvieron en cuenta las proteínas que se identificaron con 2 o más péptidos en al menos 2 experimentos.

20. Bases de datos y programas de anotación funcional.

Se buscó información sobre las proteínas identificadas (función, proceso biológico, localización, etc) consultando las siguientes bases de datos: Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>), *Protein knowledgebase* (UniProtKB) (<http://www.uniprot.org/>), *Saccharomyces Genome Database* (SGD) (<http://www.yeastgenome.org/>), *Candida Genome Database* (CGD) (<http://www.candidagenome.org/>) y *PROTEOME* (<http://portal.biobase-international.com/>).

También se utilizaron herramientas informáticas para realizar evaluaciones estadísticas de las listas de proteínas identificadas respecto a anotaciones ya existentes, como el Funspec (acrónimo de *Functional Specification*, <http://funspec.med.utoronto.ca/>) (Robinson y col., 2002), FATIGO (<http://fatigo.bioinfo.cipf.es/>) (Al-Shahrour y col., 2005) y GENECODIS (<http://genecodis2.dacya.ucm.es/>) (Carmona-Sáez y col., 2007).



RESULTADOS

1. Estudio comparativo de rasgos fenotípicos asociados a la virulencia en cepas de *S. cerevisiae* de origen comercial.

Varias cepas de *S. cerevisiae* de origen comercial (dos cepas de panadería y una de un preparado probiótico) que fueron relacionadas mediante caracterización molecular con varios aislados clínicos (de Llanos y col., 2004) han sido descritas como posible origen de infección por *S. cerevisiae* (de Llanos y col., 2006). Además, se han descrito casos clínicos que sugieren el origen de infección por *S. cerevisiae* en la administración oral del probiótico *S. cerevisiae* var. *boulardii* (Enache-Angoulvant y Hennequin, 2005) o de suplementos dietéticos (Jensen y Smith, 1976). Por esta razón se decidió abordar un estudio de rasgos fenotípicos asociados a virulencia en aislados de *S. cerevisiae* procedentes de suplementos dietéticos y de probióticos en colaboración con el grupo de la Dra. M^a Teresa Fernández-Espinar y la Dra. Amparo Querol del IATA.

1.1. Estudio del crecimiento a diferentes temperaturas.

McCusker y col. (1994b) relacionaron la virulencia de cepas de *S. cerevisiae* con su capacidad para crecer a 42°C. Por ello se decidió estudiar el crecimiento a esta temperatura de las cepas aisladas de productos comerciales por el grupo de la Dra. M^a Teresa Fernández-Espinar y la Dra. Amparo Querol, y compararlo con el de un aislado clínico y cepas de laboratorio usadas como control. Se eligió también la temperatura de 37°C por ser la temperatura basal del cuerpo humano y 39°C por observarse esta temperatura en pacientes febriles. La temperatura de 30°C se usó como control, ya que es una temperatura óptima para el crecimiento de la mayoría de cepas de *S. cerevisiae*.

Las levaduras utilizadas en estos experimentos fueron: las cepas D2, D4, D5, D6, D14 y D23, aisladas de suplementos dietéticos, alimentos enriquecidos y probióticos; el aislado clínico 102 como cepa virulenta (de Llanos y col., 2011); y las cepas avirulentas W303 (de laboratorio) y 10431 (cepa vínica de la CECT) (de Llanos y col., 2011; Llopis, 2012).

Mediante el método de siembra en placa con gotas de diferentes concentraciones de células se determinó el crecimiento de las diferentes cepas a las temperaturas señaladas (30, 37, 39 y 42°C) en YPD (figura 14).

Las cepas 10431 y W303 fueron capaces de crecer sólo a 30 y 37°C. La cepa D4 fue capaz de crecer, aunque débilmente, a 39°C y sólo las cepas D2, D5 y D14 crecieron a 42°C al igual que el aislado clínico 102. Cabe destacar que las cepas híbridas (D6 y D23) sólo crecieron a 30°C. El crecimiento observado a 42°C de la

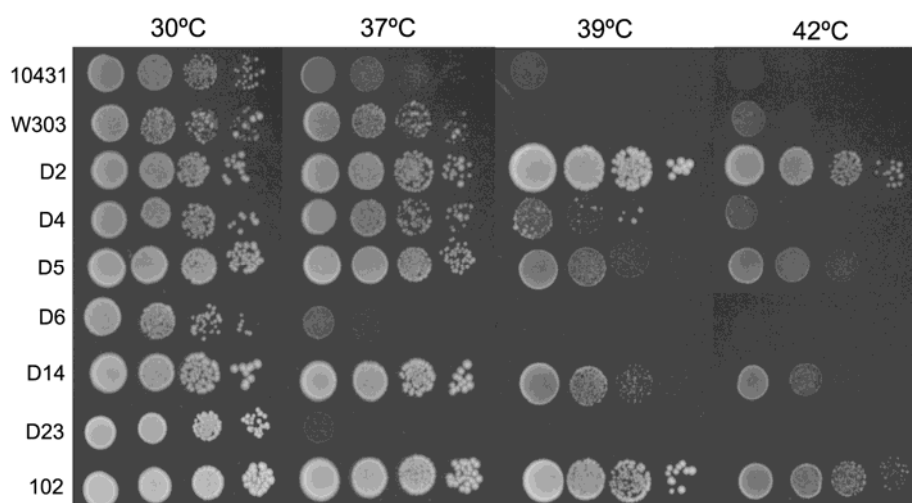


Figura 14. Crecimiento en YPD a diferentes temperaturas (30, 37, 39 y 42°C) de las cepas 10431, W303, D2, D4, D5, D6, D14, D23 y 102 de *S. cerevisiae*. En esta imagen se muestran resultados representativos de las tres replicas biológicas realizadas.

cepa D5 (Ultralevura®) está de acuerdo con los datos descritos anteriormente (de Llanos y col., 2011).

Para analizar el crecimiento a 30 y 37°C en más detalle, se determinó el tiempo de generación a estas temperaturas de las mismas cepas (tabla 2). No se determinó el tiempo de generación a 37°C de las cepas D6 y D23, debido a que estas cepas no eran capaces de crecer a esta temperatura.

Las cepas D2, D5 y D14 mostraron un tiempo de generación a 30 y 37°C significativamente menor que las cepas avirulentas control 10431 y W303, y

Tabla 2. Tiempo de generación de las cepas 10431, W303, D2, D4, D5, D6, D14, D23 y 102 de *S. cerevisiae* en YPD a 30 y 37°C.

Cepa	Tiempo de generación (min) a 30°C	Tiempo de generación (min) a 37°C
10431	120.0 ± 12.0	208.5 ± 27.6
W303	156.6 ± 7.9	264.8 ± 24.9
D2	82.1 ± 5.1*	95.0 ± 2.6*
D4	117.5 ± 1.1	142.5 ± 4.5*
D5	81.2 ± 0.5*	99.1 ± 3.7*
D6	153.0 ± 4.0	nd
D14	71.5 ± 4.5*	69.1 ± 1.0*
D23	117.4 ± 15.0	nd
102	77.7 ± 3.4*	77.4 ± 2.8*

Estos datos son el promedio de tres experimentos diferentes. **p-value*<0.05 con respecto a las cepas 10431 y W303, según la prueba t de Student. nd: no determinado.

similar al del aislado clínico 102. El tiempo de generación de la cepa D4 fue menor que el de las cepas de laboratorio pero superior al de la cepa clínica. La cepa D14 mostró los tiempos de generación más bajos en ambas temperaturas (alrededor de la mitad y de un tercio que el de las cepas avirulentas control a 30 y 37°C, respectivamente). En contraste con las otras cepas ensayadas, la cepa D14, al igual que el aislado clínico 102, no mostró aumento en el tiempo de generación a 37°C, lo que indica que ambas temperaturas (30 y 37°C) son óptimas para su crecimiento.

1.2. Análisis del fenómeno de *switching* colonial.

El fenómeno de *switching* ha sido descrito en algunos hongos como *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. neoformans*. Es un mecanismo de plasticidad fenotípica que se manifiesta por cambios espontáneos reversibles en la morfología de las colonias y se produce con una frecuencia de entre 10^{-3} y 10^{-4} (nº colonias/nº colonias totales). El *switching* colonial ha sido asociado con la virulencia en estos hongos (Soll, 1988; Soll, 1992; van Burik y Magee, 2001; Jain y col., 2006), así como en *S. cerevisiae* (Clemons y col. 1996).

Hemos estudiado este fenómeno en cuatro de las cepas aisladas de los suplementos dietéticos y alimentos enriquecidos (D2, D4, D14 y D23) mediante el análisis de los cambios fenotípicos de 6000 a 8000 colonias en medio YPD con phloxina B. Las cuatro cepas mostraron un fenotipo principal y varios fenotipos secundarios, estos últimos con una frecuencia de aparición de entre 3.4×10^{-2} y 1.91×10^{-4} (nº colonias/nº colonias totales) (tabla 3). En concreto se observaron nueve fenotipos en la cepa D2, seis en la cepa D4 y ocho en las cepas D14 y D23. En las figuras 15, 16, 17 y 18 se muestran ejemplos de los fenotipos coloniales observados.

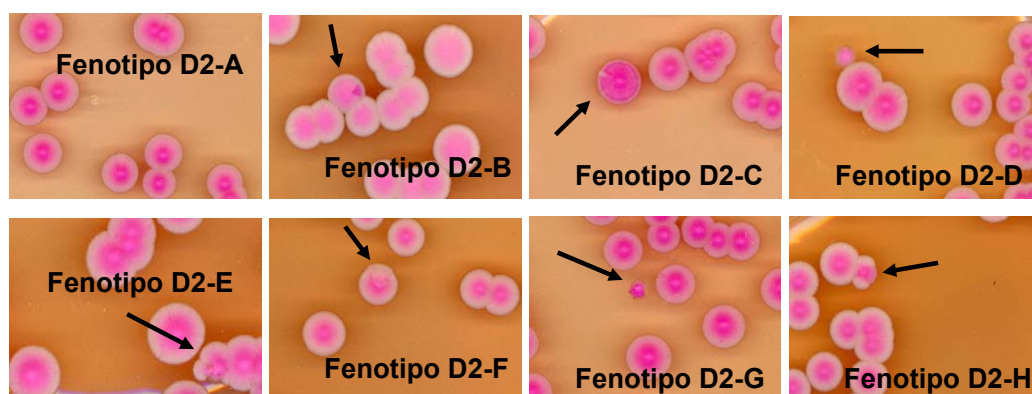


Figura 15. Distintos fenotipos coloniales de la cepa D2 de *S. cerevisiae* en el fenómeno de *switching*.

Tabla 3. Frecuencia de aparición (nº colonias/nº colonias totales) de los distintos fenotipos coloniales de las cepas D2, D4, D14 y D23 de *S. cerevisiae* en el fenómeno de *switching* en medio YPD con phloxina B.

Cepa	Fenotipo principal Número de colonias (frecuencia)	Fenotipos secundarios Número de colonias (frecuencia)							
		D2-B	D2-C	D2-D	D2-E	D2-F	D2-G	D2-H	D2-I
D2	D2-A								
	10332 (0.99)	71 (6.79.10 ⁻³)	31 (2.96.10 ⁻³)	10 (9.56.10 ⁻⁴)	3 (2.87.10 ⁻⁴)	7 (6.69.10 ⁻⁴)	2 (1.91.10 ⁻⁴)	2 (1.91.10 ⁻⁴)	2 (1.91.10 ⁻⁴)
D4	D4-A	D4-B	D4-C	D4-D	D4-E	D4-F			
	7715 (0.95)	65 (7.98.10 ⁻³)	284 (3.48.10 ⁻²)	7 (8.59.10 ⁻⁴)	6 (7.36.10 ⁻⁴)	73 (8.96.10 ⁻³)			
D14	D14-A	D14-B	D14-C	D14-D	D14-E	D14-F	D14-G	D14-H	
	6565 (0.99)	18 (2.27.10 ⁻³)	4 (6.06.10 ⁻⁴)	2 (3.03.10 ⁻⁴)	3 (4.55.10 ⁻⁴)	6 (9.09.10 ⁻⁴)	2 (3.03.10 ⁻⁴)	1 (1.52.10 ⁻⁴)	
D23	D23-A	D23-B	D23-C	D23-D	D23-E	D23-F	D23-G	D23H	
	8284 (0.96)	287 (3.32.10 ⁻²)	13 (1.50.10 ⁻³)	19 (2.20.10 ⁻³)	2 (2.31.10 ⁻⁴)	12 (1.39.10 ⁻³)	23 (2.66.10 ⁻³)	2 (2.31.10 ⁻⁴)	

Descripción de los distintos fenotipos coloniales: D2A (Colonias de 5-7 mm, rosa claro, centro de color rosa más fuerte, borde claro, textura cremosa); D2B (Colonias de 5-7 mm, rosa claro, centro de color rosa más fuerte, borde claro, textura cremosa, con sector rosa fuerte); D2C (Colonias de 5-7 mm, rosa fuerte, sin borde claro, textura rugosa, estriadas); D2D (Colonias de 3 mm, rosa claro, centro de color rosa más fuerte, textura cremosa); D2E (Colonias de 5-7 mm, rosa claro, centro de color rosa más fuerte, borde claro, textura cremosa, forma estrellada); D2F (Colonias de 5-7 mm, rosa claro, centro de color rosa más fuerte, borde claro, textura cremosa, con sector blanquecino); D2G (Colonias de 3 mm, color rosa fuerte, textura cremosa, irregular); D2H (Colonias de 4 mm, rosa claro, centro color rosa más fuerte, textura rugosa, con sector rosa fuerte); D2I (Colonias de 5-7 mm, rosa claro, centro color rosa más fuerte, textura rugosa, estriadas); D4A (Colonias de 5mm, rosa claro, centro color rosa más fuerte, textura cremosa); D4B (Colonias de 2mm, rosa claro, centro color rosa más fuerte, textura cremosa, irregular); D4C (Colonias de 1mm, rosa claro, textura cremosa, irregular); D4D (Colonias de 3mm, rosa fuerte, textura cremosa); D4E (Colonias de 5mm, rosa claro, centro color rosa más fuerte, textura cremosa, con sector blanquecino); D4F (Colonias de 5mm, rosa claro, centro color rosa más fuerte, textura cremosa, irregular); D14A (Colonias de 5 mm, rosa claro, centro color rosa claro, borde rosa más fuerte, textura cremosa); D14B (Colonias de 2-3 mm, rosa pálido, textura cremosa); D14C (Colonias de 2-3 mm, rosa claro, centro color rosa más fuerte, textura cremosa); D14D (Colonias de 5 mm, rosa claro, centro color rosa claro, borde rosa más fuerte, textura cremosa, con sector rosa fuerte); D14E (Colonias de 5 mm, rosa claro, centro color rosa claro, borde rosa más fuerte, textura cremosa, con sector rosa fuerte); D14F (Colonias de 5 mm, rosa fuerte, borde rosa más fuerte, textura cremosa,); D14G (Colonias de 5 mm, rosa claro, borde rosa más fuerte, textura cremosa, con estrías); D14H (Colonias de 2 mm, rosa claro, borde rosa fuerte, textura cremosa); D23A (Colonias de 4-5mm, rosa claro, centro color rosa más fuerte, textura cremosa); D23B (Colonias de 1-2 mm, rosa fuerte, textura cremosa); D23C (Colonias de 4-5 mm, rosa claro, centro color rosa más fuerte, textura cremosa, forma irregular); D23D (Colonias de 4 mm, rosa medio, textura cremosa); D23E (Colonias de 7-8 mm, rosa claro, centro color rosa más fuerte, textura cremosa); D23F (Colonias de 4-5 mm, rosa claro, centro color rosa más fuerte, textura rugosa, estriada); D23G (Colonias de 5 mm, rosa claro, textura cremosa, con sectores rosa más fuerte); D23H (Colonias de 1-2 mm, rosa claro, centro color rosa más fuerte, textura cremosa).

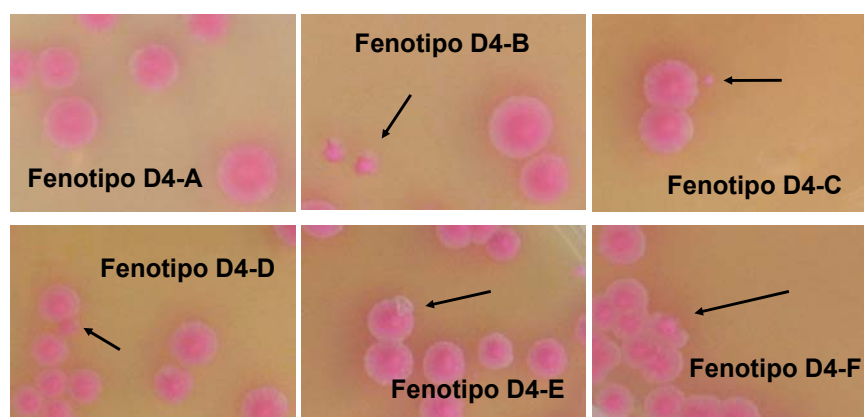


Figura 16. Distintos fenotipos coloniales de la cepa D4 de *S. cerevisiae* en el fenómeno de *switching*.

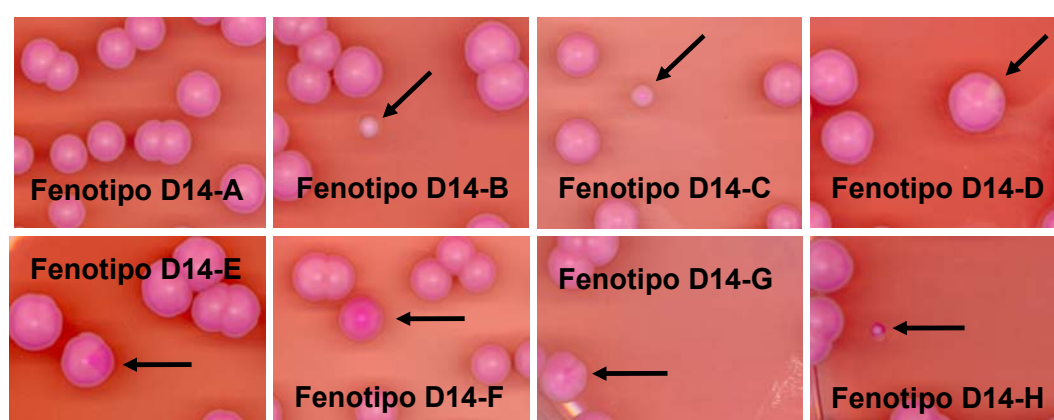


Figura 17. Distintos fenotipos coloniales de la cepa D14 de *S. cerevisiae* en el fenómeno de *switching*.

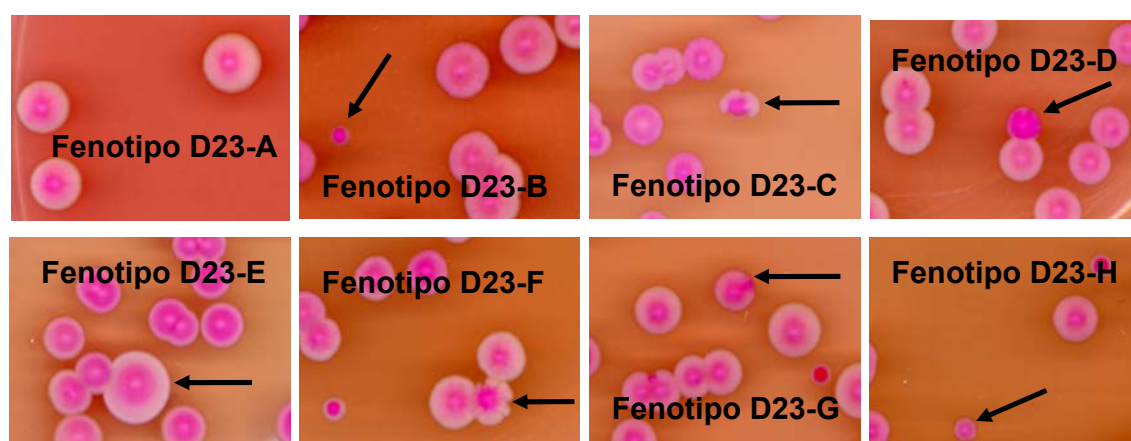


Figura 18. Distintos fenotipos coloniales de la cepa D23 de *S. cerevisiae* en el fenómeno de *switching*.

Se estudió la estabilidad y la reversión de algunos de estos fenotipos secundarios hallándose que había tanto fenotipos reversibles como estables en las cuatro cepas analizadas (no se muestran los datos). Los fenotipos secundarios

estables fueron capaces de revertir al fenotipo principal con baja frecuencia, excepto dos fenotipos secundarios de las cepas D4 y D14. Estos resultados indican que las cuatro cepas muestran un comportamiento similar respecto al *switching* colonial.

1.3. Activación de las rutas de MAPKs.

Como ya se ha comentado en la introducción, la pseudofilamentación en *S. cerevisiae* ha sido relacionada con el origen clínico de los aislados y con su virulencia (Clemons y col., 1994; McCusker y col., 1994b; de Llanos y col., 2006). Una de las rutas que regulan el crecimiento pseudohifal es la de la MAPK Kss1, por lo que se decidió estudiar su activación así como la de la MAPK Slt2, implicada en el mantenimiento de la integridad de la pared celular, en las cepas procedentes de suplementos dietéticos y probióticos de *S. cerevisiae*.

Para ello se llevó a cabo la detección de las formas doblemente fosforiladas en la treonina y la tirosina conservadas en el dominio de activación de estas proteínas mediante *Western blotting*, usando el anticuerpo policlonal anti-phospho44/p42 (Thr-202/Tyr-204) que reconoce específicamente las MAPK activadas (Martín y col., 2000). Para detectar la cantidad total de Slt2 y Kss1 se utilizaron anticuerpos anti-Slt2 y anti-Kss1.

Las cepas a analizar fueron incubadas a 24°C, en ausencia de estimulación de las rutas de transducción de señales, para conocer su nivel de activación constitutivo. La comparación entre cepas aisladas de diferentes orígenes plantea cierta dificultad, ya que sus fondos genéticos pueden ser muy distintos. Por ello, se utilizó para la comparación una cepa de referencia de laboratorio: *S. cerevisiae* BY4741, al igual que en un estudio similar realizado sobre cepas de origen clínico publicado anteriormente por nuestro grupo (de Llanos y col., 2010). Como control positivo de activación de Slt2 se utilizó esta misma cepa incubada una hora a 39°C ya que en estas condiciones aumenta la fosforilación de Slt2 (Martín y col., 2000).

En la figura 19 se muestran los resultados obtenidos. La cepa D5, y sobre todo la D6 y la D14 mostraron una mayor fosforilación de la MAPK Slt2 que el resto de las cepas de origen dietético, mientras que en el caso de la MAPK Kss1 sólo se detectó fosforilación en la cepa D5, lo que concuerda con lo descrito para esta cepa por de Llanos y col. (2010).

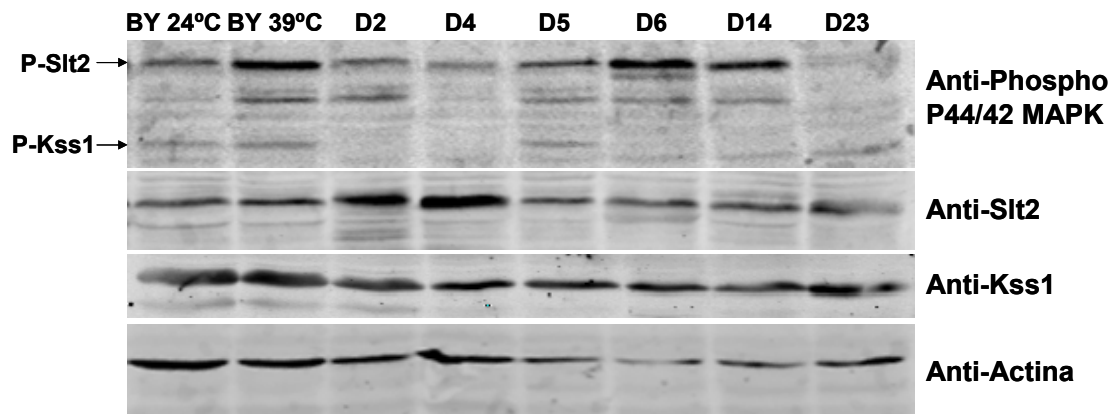


Figura 19. Análisis mediante *Western blotting* de extractos proteicos procedentes de las cepas de *S. cerevisiae* D2, D4, D5, D6, D14 y D23 aisladas de suplementos dietéticos, alimentos enriquecidos y probióticos y de la cepa BY 4741 incubada a 24 y 39°C, usando los anticuerpos que aparecen indicados en los paneles. La imagen que se muestra es representativa de los tres experimentos realizados.

1.4. Estudio de morfología celular.

También se observó la morfología celular de las distintas cepas de *S. cerevisiae* mediante microscopía de contraste de fases. Como se observa en la figura 20, todas las cepas mostraron una morfología ovalada, exceptuando la cepa D5 que muestra una morfología ligeramente alargada. Como ya había sido descrito anteriormente por de Llanos y col. (2010), las formas alargadas podrían estar relacionadas con la activación basal de Kss1 observada en esta cepa.

1.5. Estudio de adhesión a plástico.

La capacidad de adherencia de *C. albicans* se considera un importante factor de virulencia (Blanco y col., 2010), ya que permite la colonización y el posterior desarrollo de la infección (Rotrosen y col., 1986; el-Azizi y Khardori, 1999). En la adherencia están implicados mecanismos de diferente naturaleza, unos que establecen uniones de carácter físico-químico y otros de naturaleza específica y que implican la presencia de adhesinas y receptores (Blanco y col., 2010).

Un factor de riesgo en las candidiasis invasivas es la cateterización debido a que la adhesión de este microorganismo a los catéteres puede ser un origen de infección. De la misma forma se ha relacionado la cateterización como posible origen de infección de *S. cerevisiae* var. *boulardii* (Hennequin y col., 2000), por lo que se decidió abordar el estudio de la adhesión de *S. cerevisiae* a diferentes materiales plásticos, entre ellos catéteres de uso común en las unidades de cuidados intensivos.

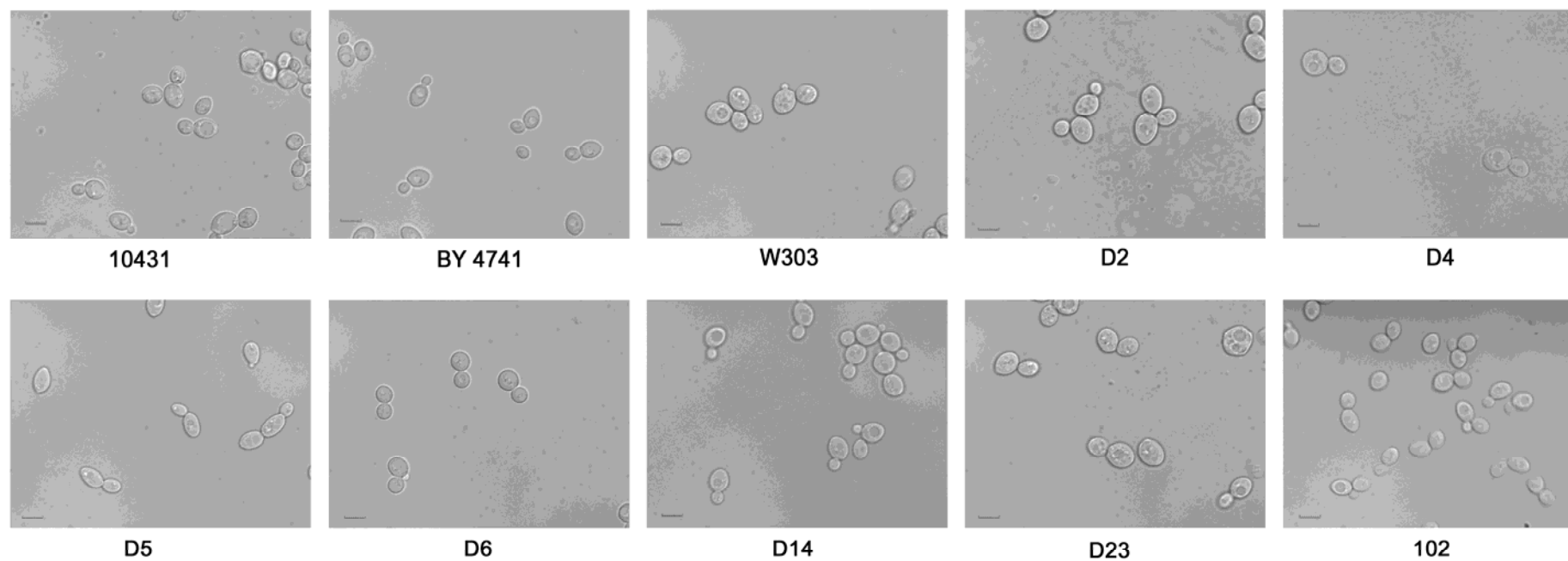


Figura 20. Fotografías de microscopía de contraste de fases de las cepas indicadas de *S. cerevisiae*. Barra: 5 μ m.

1.5.1. Adhesión a poliestireno.

Para estudiar la adherencia al poliestireno, se utilizaron dos materiales: placas de petri y placas de 96 pocillos. Las levaduras utilizadas en estos experimentos fueron: las cepas D2, D4, D5, D6, D14 y D23 de *S. cerevisiae* aisladas de productos comerciales, el aislado clínico Nº 102, la cepa SC5314 de *C. albicans*, que se usó como control positivo de adhesión, y las cepas de laboratorio BY4741 y W303 de *S. cerevisiae*.

Como se puede observar en la figura 21, las cepas estudiadas muestran diferentes grados de adhesión al poliestireno. En los ensayos en placa Petri (figura 21A), la cepa D5 mostró una muy baja adhesión similar a la cepa BY 4741 e incluso menor que la cepa W303; las cepas D14 y D23 mostraron una adhesión baja comparable a la cepa W303 y mayor que la de la cepa BY4741; la cepa D2 mostró una adhesión alta comparable al control positivo *C. albicans* SC5314 y las cepas D4, D6 y 102 mostraron una adhesión muy alta, mayor que la de *C. albicans* SC5314.

En los ensayos de adhesión en placas multipocillo (figura 21B), la cepa D6 fue la que mostró el mayor grado de adhesión entre las cepas comerciales, mientras que en el resto de cepas se obtuvieron valores iguales o inferiores a los de las cepas control de laboratorio. Sorprendentemente, mientras que la cepa clínica 102 mostró una alta adhesión en este ensayo, la cepa SC5314 de *C. albicans* no mostró mayor adhesión que las cepas de laboratorio de *S. cerevisiae*.

Podemos concluir que las cepas D6 y 102 mostraron una alta adhesión al poliestireno en ambos ensayos, mientras que la cepa D5 mostró un bajo grado de adhesión en ambos ensayos.

1.5.2. Adhesión a catéteres.

Para estudiar la adhesión a catéteres se eligieron varias cepas: la cepa SC5314 de *C. albicans* como un control positivo de adhesión, la cepa 102, ya que mostraba una alta adhesión a poliestireno y es de origen clínico y virulenta en modelo murino, las cepas de laboratorio BY4741 y W303, y las cepas D5 y D14, por ser las dos cepas de origen comercial estudiadas que mostraron virulencia en el modelo experimental de ratón (de Llanos y col., 2011; Llopis, 2012). Estos experimentos se realizaron con catéteres de poliuretano que se utilizan por vía intravenosa para pacientes críticos donde la cateterización se mantiene durante un largo periodo de tiempo. Se utilizaron dos medios: 1) solución glucosalina, ya que este medio imita al medio ambiente en contacto con el lumen del catéter y 2) el medio de cultivo de

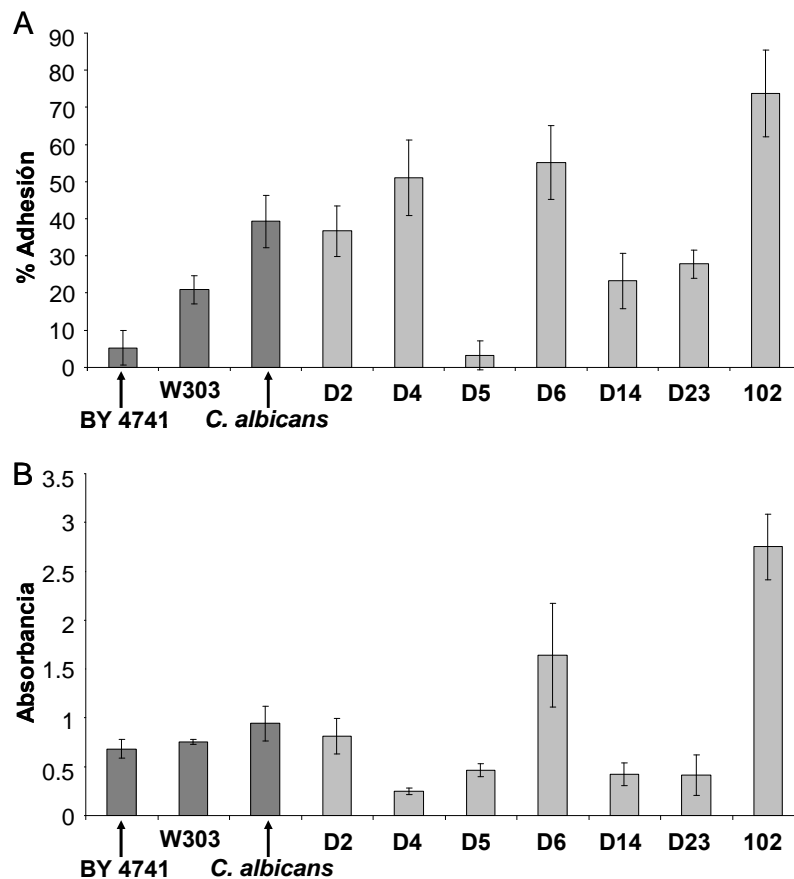


Figura 21. Adhesión a poliestireno de las cepas BY 4741, W303, D2, D4, D5, D14, D23 y 102 de *S. cerevisiae* y SC 5314 de *C. albicans*. A. % de células adheridas a placa Petri. B. Adhesión a placa multipocillo determinada por la absorbancia de la solución en la que se disolvió el cristal de violeta que teñía las células adheridas al pocillo. Todos los datos son el promedio de cuatro experimentos diferentes y las barras de error representan la desviación estándar.

células RPMI debido a que imita el área de contacto con el lado externo del catéter. Los datos de adhesión a catéteres tras 1 o 24 h de contacto se muestran en la tabla 4.

La cepa D5 mostró una adhesión muy baja en todas las condiciones ensayadas, similar a la de las cepas de laboratorio; la cepa D14 también mostró baja adhesión en la mayoría de las condiciones pero siempre superior a la de la cepa D5. Hay que destacar que cuando se usó solución glucosalina como medio la adhesión de la cepa D14, aunque baja en comparación con el aislado clínico 102 de *S. cerevisiae* y la cepa de *C. albicans*, fue significativamente superior a la de la cepa de laboratorio BY4741. En contraste, el aislado clínico 102 de *S. cerevisiae* y la cepa SC5314 de *C. albicans* mostraron una adhesión similar y alta en solución glucosalina, lo que concuerda con los resultados obtenidos en los experimentos de adhesión a poliestireno, mientras que en medio RPMI la cepa 102 mostró menos adhesión que *C. albicans*. En RPMI *C. albicans* fue capaz de formar biopelículas adheridas a los catéteres a las 24 h de incubación.

Tabla 4. Adhesión a catéteres de las cepas BY 4741, W303, D5, D14 y 102 de *S. cerevisiae* y la cepa SC 5314 de *C. albicans* tras diferentes condiciones de incubación. Los catéteres se incubaron con 10^7 células, tras lo cual se lavaron arrastrando las células adheridas y esta solución se sembró en placa, midiendo así las células adheridas mediante recuento de UFC.

Cepa	Medio de incubación	Tiempo de incubación	UFC	DESV. EST.	Adhesión
BY 4741	S. glucosalina	1 hora	8.75 [^]	8.48	-
W303	S. glucosalina	1 hora	5.71 [^]	6.73	-
<i>C. albicans</i> SC5314	S. glucosalina	1 hora	1635.83 [*]	704.66	++
D5	S. glucosalina	1 hora	0.83 [^]	2.04	-
D14	S. glucosalina	1 hora	197.14 ^{*^}	96.45	+
102	S. glucosalina	1 hora	1709 [*]	707.19	++
BY 4741	S. glucosalina	24 horas	4.17 [^]	4.08	-
W303	S. glucosalina	24 horas	0.71 [^]	1.22	-
<i>C. albicans</i> SC5314	S. glucosalina	24 horas	401.4 [*]	140.76	++
D5	S. glucosalina	24 horas	0.83 [^]	1.29	-
D14	S. glucosalina	24 horas	11.25 [^]	7.87	-
102	S. glucosalina	24 horas	211.5 ^{*^}	103.33	++
BY 4741	RPMI	1 hora	2.5 [^]	5.59	-
W303	RPMI	1 hora	0 [^]	0	-
<i>C. albicans</i> SC5314	RPMI	1 hora	19466.67 [*]	5994.16	+++
D5	RPMI	1 hora	0 [^]	0	-
D14	RPMI	1 hora	16.67 ^{*^}	9.31	-
102	RPMI	1 hora	90 ^{*^}	34.41	+
BY 4741	RPMI	24 horas	12 [§]	7.79	-
W303	RPMI	24 horas	0 [§]	0	-
<i>C. albicans</i> SC5314	RPMI	24 horas	Biofilm [§]		+++
D5	RPMI	24 horas	0 [§]	0	-
D14	RPMI	24 horas	12 [§]	7.37	-
102	RPMI	24 horas	1241.25 ^{*§}	425.77	++

Estos datos son el promedio de cuatro experimentos diferentes. ^{*} La adhesión es mayor que la de *S. cerevisiae* BY 4741 en las mismas condiciones con un $p\text{-value}<0.05$. [^] La adhesión es menor que la de *C. albicans* SC5314 en las mismas condiciones con un $p\text{-value}<0.05$. [§] Al incubar las cepas en RPMI durante 24 horas no se puede hacer el estudio estadístico frente a *C. albicans* SC5314 ya que su adhesión a catéteres es mucho mayor que el resto de cepas debido a la formación de biofilm, Adhesión: se considera +++ cuando el recuento de unidades formadoras de colonias es mayor de 5000 o hay formación de biofilm, ++ cuando es menor de 5000 y mayor de 500, + cuando es menor de 500 y mayor de 20 y - cuando es menor de 20.

Si analizamos todos los datos de adhesión en conjunto, podemos destacar que la cepa D5, cepa que se puede encontrar en un ambiente hospitalario, es de las cepas que muestra menor adhesión a los diferentes plásticos estudiados, mientras que el aislado clínico 102 muestra un alto grado de adhesión a todos ellos. Las cepas aisladas de suplementos dietéticos muestran diferente grado de adhesión siendo siempre inferior al del aislado 102.

En la tabla 5 se muestra un resumen de los resultados obtenidos del estudio de los diferentes rasgos con posible asociación a la virulencia, así como la

Tabla 5. Resumen de los rasgos con posible asociación a la virulencia estudiados en las cepas aisladas de suplementos dietéticos, alimentos enriquecidos y probióticos de *S. cerevisiae* (D2, D4, D5, D6, D14 y D23), del aislado clínico 102 de *S. cerevisiae* y de cepas control de laboratorio de *S. cerevisiae* (10431, W303, BY 4741) y *C. albicans* (SC5214).

Cepa	Virulencia (modelo murino)	Crecimiento			Switching colonial	Activación de Slt2	Activación de Kss1	Adhesión a placa Petri	Adhesión a placa multipocillo	Adhesión a catéteres sol. gs. 1h	Adhesión a catéteres RPMI 1h	Adhesión a catéteres sol. gs. 24h	Adhesión a catéteres RPMI 24h
		37°C	39°C	42°C									
10431	- ^a	+++	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BY 4741	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	±	-	-	-	-
W303	- ^c	+++	-	-	nd	nd	nd	±	±	-	-	-	-
D2	± ^c	+++	+++	+++	+	-	-	+	±	nd	nd	nd	nd
D4	± ^c	+++	++	±	+	-	-	+	-	nd	nd	nd	nd
D5	+ ^a	+++	+++	++	nd	+	+	-	-	-	-	-	-
D6	nd	±	-	-	nd	++	-	++	++	nd	nd	nd	nd
D14	+ ^c	+++	+++	++	+	+	-	±	-	+	-	-	-
D23	- ^c	-	-	-	+	-	-	±	-	nd	nd	nd	nd
102	+ ^a	+++	+++	+++	nd	- ^d	- ^g	++	++	++	++	+	++
<i>C. albicans</i> SC5314	+ ^b	+++	+++	+++	nd	nd	nd	+	+	++	++	+++	+++

^a descrito por de Llanos y col. (2011); ^b descrito por Diez-Orejas y col. (1997); ^c descrito por Llopis (2012); ^d descrito por de Llanos y col. (2010); nd: no determinado; sol. gs: solución glucosalina; Crecimiento a 37, 39 y 42°C: Se considera +++ cuando han crecido hasta la última dilución, ++ cuando han crecido 2 diluciones, + cuando ha crecido hasta una dilución, ± cuando crece sin dilución y - cuando no crece. Grado de activación de las rutas de transducción de señales: Se considera - cuando hay igual o menor activación que en la cepa BY 4741, + cuando hay mayor activación que en la cepa BY 4741 y ++ cuando hay una activación similar a la de la cepa BY 4741 a 39°C. Adhesión a placa Petri y a placa multipocillo: Se considera ++ cuando la adhesión es mayor que *C. albicans* SC5314 con un *p-value*<0.05, + cuando es comparable a *C. albicans* SC5314, ± cuando es comparable a W303 y - cuando es menor que W303 con un *p-value*<0.05. Adhesión a catéteres: se considera +++ cuando el recuento de unidades formadoras de colonias es mayor de 5000 o hay formación de biofilm, ++ cuando es menor de 5000 y mayor de 500, + cuando es menor de 500 y mayor de 20 y - cuando es menor de 20.

virulencia mostrada en modelo murino descrita por de Llanos y col. (2011) y por Llopis (2012).

2. Análisis de la respuesta serológica a la infección sistémica por *S. cerevisiae*.

Cuando se produce una infección, uno de los mecanismos de defensa del sistema inmune del organismo es la producción de anticuerpos frente a antígenos del microorganismo. La inmunoproteómica es una estrategia ampliamente usada para el estudio de la respuesta serológica de manera global e integrada, que permite la identificación a gran escala de proteínas inmunogénicas. Hasta la fecha no se han publicado estudios de este tipo en *S. cerevisiae*, sin duda debido a su nueva inclusión entre los patógenos oportunistas. Por ello, para estudiar la interacción de esta levadura con el hospedador, se decidió analizar la respuesta serológica a la infección sistémica por *S. cerevisiae* mediante inmunoproteómica y compararla con la producida por *C. albicans*.

2.1. Infección de ratones.

La obtención de sueros de ratones infectados por *S. cerevisiae* se llevó a cabo por el grupo de las Dras. M^a Teresa Fernández-Espinar y Amparo Querol en el IATA de Valencia. Se utilizaron dos tipos de ratones, los ICR/Swiss y los ICR/Swiss a los que se les indujo neutropenia con ciclofosfamida, que fueron inoculados con dos cepas de *S. cerevisiae*, la D14 (aislada de suplementos dietéticos) por presentar rasgos asociados a la virulencia y virulencia en modelo murino, y la W303 (de laboratorio) como control negativo de virulencia (Llopis, 2012). Para realizar los experimentos se utilizó el modelo de infección sistémica de ratón, inyectando una dosis de $2 \cdot 10^7$ células en la vena de la cola. Los sueros se obtuvieron a 15 y 30 días post-infección. También se incluyeron en este trabajo sueros de ratones sin infectar como control (figura 22). En estas condiciones las cepas ensayadas no causaron muerte de ratones.

2.2. Detección e identificación de proteínas inmunorreactivas de *S. cerevisiae*.

En primer lugar, se separaron extractos citoplásmicos de las cepas D14 y W303 de *S. cerevisiae* mediante electroforesis bidimensional 2D-PAGE y se tiñeron con

plata.

En ambos geles se detectaron más de 1000 manchas proteicas con una masa molecular que variaba entre 15-150 kDa y valores de pI de 3 a 11 (figura 23). Los patrones proteicos de los geles de las dos cepas fueron similares pero no idénticos (figura 23). Con el fin de detectar las proteínas inmunorreactivas frente a todos los sueros de los ratones infectados con ambas cepas, se realizó una mezcla de los extractos de proteínas citoplásmicas de las cepas D14 y W303. Esta mezcla fue separada en lotes de tres geles bidimensionales en paralelo y un gel de cada lote se tiñó con azul de Coomassie coloidal para ser utilizado como mapa de referencia. Los otros dos geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se utilizaron para la inmunodetección. Para asegurar la reproducibilidad de la técnica, los sueros se ensayaron por lo menos dos veces utilizando membranas diferentes.

Los *Western blots* realizados con los sueros de los ratones ICR infectados con las cepas D14 y W303, en los que puede observarse la existencia de inmunorreactividad, se muestran en la figura 24. Se observaron diferencias importantes dependiendo de la cepa inoculada al ratón, tanto en número de manchas proteicas detectadas como en su intensidad. Con los sueros de ratones infectados con la cepa D14 se detectaron más de 150 manchas proteicas inmunorreactivas (figura 24, A y B), mientras que con los sueros de los ratones

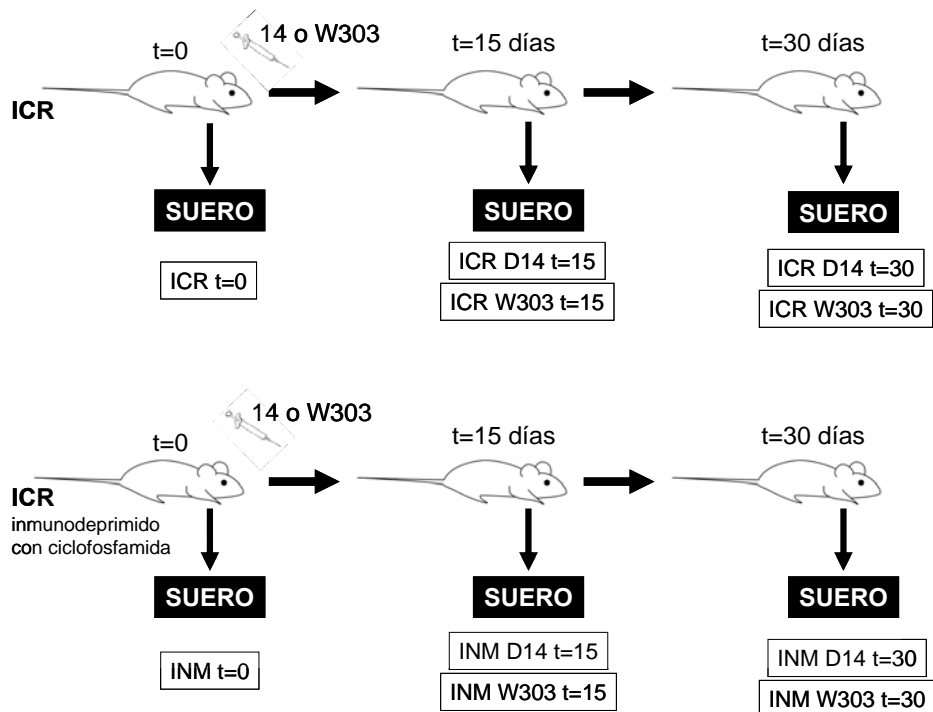


Figura 22. Esquema de obtención de sueros de ratones ICR/Swiss infectados con las cepas D14 y W303 de *S. cerevisiae*.

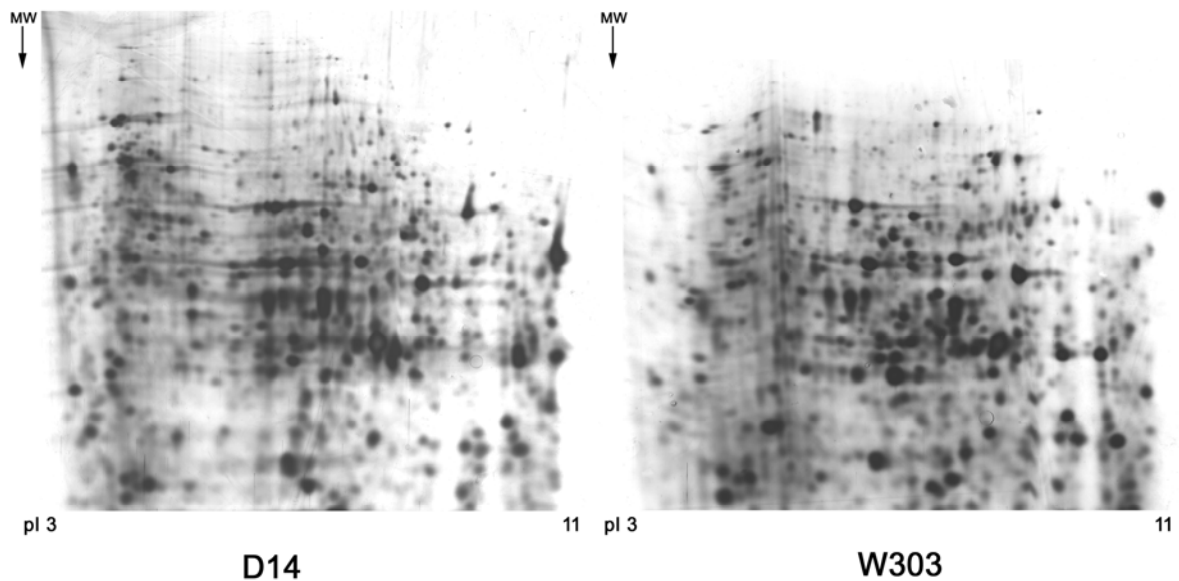


Figura 23. Geles 2D-PAGE de extractos totales proteicos de las cepas D14 y W303 de *S. cerevisiae* teñidos con plata. Las imágenes que se muestran son representativas de los tres geles realizados de cada condición.

infectados con la cepa W303 sólo se detectaron sobre 50 manchas proteicas inmunorreactivas y con menor intensidad (figura 24, C y D). Estos patrones de respuesta serológica se mantienen en el tiempo (sueros obtenidos a 15 y 30 días después de la infección) frente a cada cepa con algunas diferencias, pero menores que las encontradas entre cepas. En los análisis realizados con los suero de ratones no infectados y usando el mismo tiempo de exposición en el revelado no se detectaron manchas proteicas.

Las manchas proteicas inmunorreactivas fueron correlacionadas con las manchas de proteínas de los geles teñidos con Coomassie y se escindieron manualmente de los geles para su posterior identificación en la Unidad de Proteómica de PCM-UCM mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF usando como motor de búsqueda MASCOT [MatrixScience (<http://www.matrixscience.com>)] en una base de datos no redundante que contenía entradas de SwissProt, utilizándose como organismo de referencia *S. cerevisiae*.

Se identificaron un total de 89 manchas proteicas, correspondientes a 41 proteínas (tabla 6 y figura 25). La información referente a las identificaciones se muestra en el anexo I, tabla 1. En concreto, se han identificado 77 especies proteicas que corresponden a 41 proteínas con inmunoreactividad frente al suero "ICR D14 15 días" (figura 24 A), 44 especies proteicas que corresponden a 19 proteínas en el suero "ICR D14 30 días" (figura 24 B), 20 especies proteicas que corresponden a 13 proteínas en el suero "ICR W303 15 días" (figura 24 C) y 26 especies proteicas que corresponden a 14 proteínas en el suero "ICR W303 30 días"

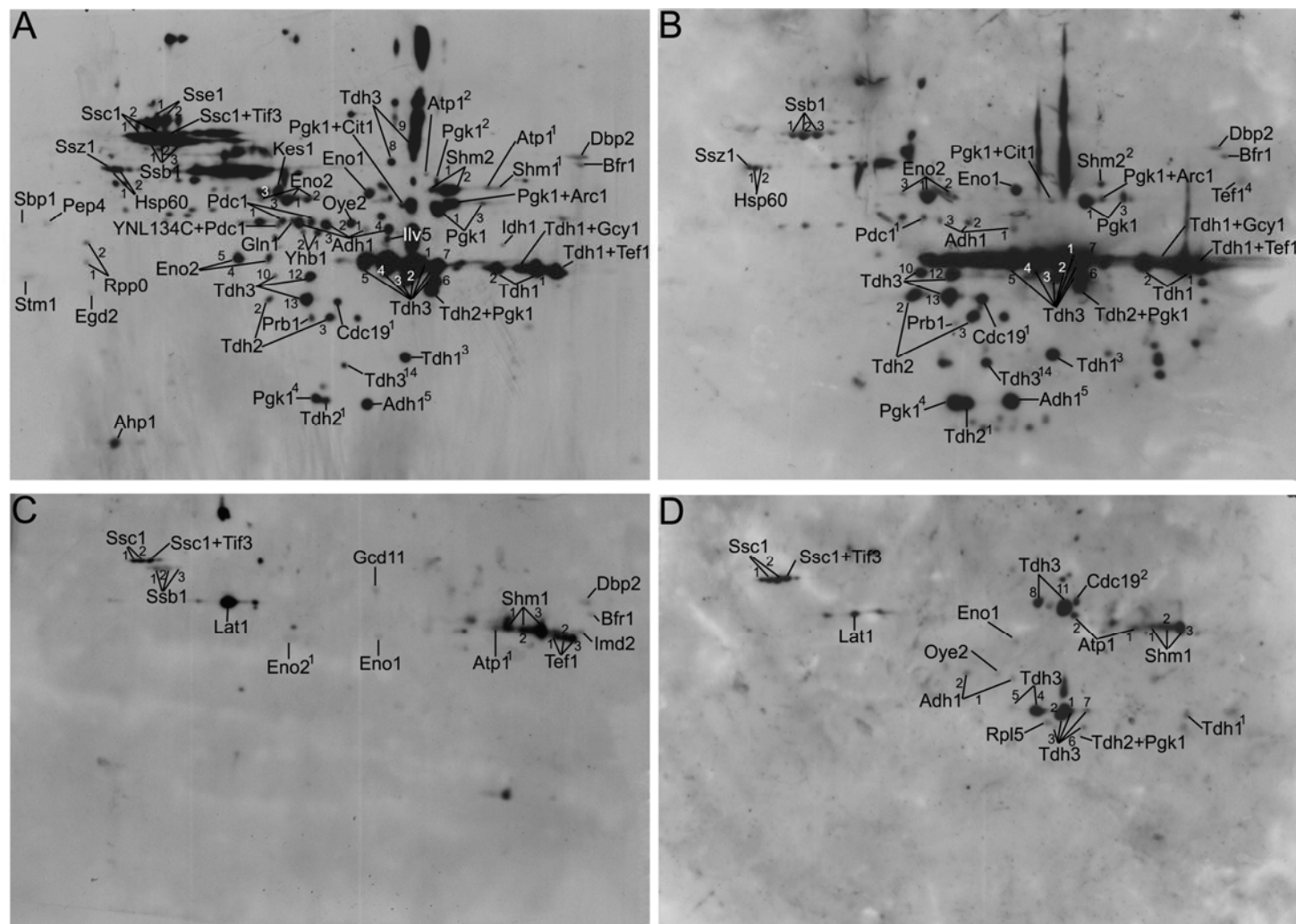


Figura 24. Análisis mediante Western blotting de las proteínas inmunorreactivas de *S. cerevisiae* frente a los sueros de ratones ICR/Swiss: A. infectados con la cepa D14 y obtenidos 15 días post-infección; B. infectados con la cepa D14 y obtenidos 30 días post-infección; C. infectados con la cepa W303 y obtenidos 15 días post-infección; D. infectados con la cepa W303 y obtenidos 30 días post-infección. Las imágenes que se muestran son representativas de los dos análisis realizados de cada condición.

¹⁻¹⁴ corresponden a diferentes especies proteicas de una misma proteína. Tiempo de exposición durante el revelado: 1 min.



Figura 25. Gel 2D-PAGE teñido con Coomassie coloidal realizado a partir de una mezcla de extractos proteicos totales de las cepas D14 y W303 de *S. cerevisiae*. Todas las proteínas detectadas en los diferentes *immunoblots* realizados e identificadas mediante espectrometría de masas se indican en sus posiciones correspondientes.

¹⁻¹⁴ corresponden a diferentes especies proteicas de una misma proteína.

Tabla 6. Diferencias en el perfil de reconocimiento de antígenos de *S. cerevisiae* por los diferentes sueros ensayados de ratones ICR/Swiss inmunocompetentes, obtenidos tras diferentes tiempos post-infección con las cepas D14 y W303.

Nombre	Descripción	ICR D14 t=15	ICR D14 t=30	ICR W303 t=15	ICR W303 t=30
Adh1 ⁽¹⁾	Alcohol deshidrogenasa 1	+	+		±
Adh1 ⁽²⁾		+++	+		±
Adh1 ⁽³⁾		+++	+		
Adh1 ⁽⁴⁾		+++			
Adh1 ⁽⁵⁾		+++	+++		
Ahp1	Alquil hidroperóxido reductasa 1	+++			
Atp1 ⁽¹⁾	ATP sintasa	++		++	++
Atp1 ⁽²⁾		+			++
Bfr1	Proteína supresora de brefeldina A	+	+	+	
Cdc19 ⁽¹⁾	Piruvato kinasa 1	+++	+++		
Cdc19 ⁽²⁾					++
Dbp2	RNA helicasa ATP-dependiente	+	+	+	
Egd2	Potenciador de la unión Gal4 a DNA	±			
Eno1	Enolasa 1	+++	+++	±	±
Eno2 ⁽¹⁾	Enolasa 2	+++	+++	±	

Tabla 6. Continuación

Nombre	Descripción	ICR D14 t=15	ICR D14 t=30	ICR W303 t=15	ICR W303 t=30
Eno2 ⁽²⁾		+++	+		
Eno2 ⁽³⁾		+			
Eno2 ⁽⁴⁾		++			
Eno2 ⁽⁵⁾		+++			
Gcd11	Factor de iniciación de la traslación 2 subunidad gamma			±	
Gln1	Glutamina sintetasa	++			
Hsp60 ^{(1) (2)}	Proteína de choque térmico 60	+++	+++		
Idh1	Isocitrato deshidrogenasa 1	+			
Ilv5	Ácido quetol reductoisomerasa	+++			
Imd2	Inosina monofosfato deshidrogenasa			+	
Kes1	Proteína de unión al oxisterol	+++			
Oye2	NADPH desidrogenasa	+++			±
Lat1	Dihidrolipoamida S-acetiltransferasa			+++	++
Pdc1 ⁽¹⁾	Piruvato descarboxilasa 1	+++	+		
Pdc1 ⁽²⁾		++			
Pdc1 ⁽³⁾		+++			
Pep4	Carboxipeptidasa Y-deficiente	±			
Pgk1 ^{(1) (4)}	3-Fosfoglicerato kinasa	+++	+++		
Pgk1 ⁽²⁾		++			
Pgk1 ⁽³⁾		+	+++		
Pgk1+Cit1 ^a	3-Fosfoglicerato kinasa + Citrato sintasa	++	+		
Pgk1+Arc1 ^a	3-Fosfoglicerato kinasa + Proteína de unión a ácidos nucleicos	+++	++		
Prb1	Proteinasa B1	++			
Rpl5	Proteína ribosomal L5				±
Rpp0 ⁽¹⁾	Proteína ribosomal P0	±			
Rpp0 ⁽²⁾		+			
Sbp1	Proteína de unión a ácido nucleico monocatenario	±			
Shm1 ⁽¹⁾	Serina hidroximetiltransferasa mitochondrial	+		+++	++
Shm1 ^{(2) (3)}				+++	+++
Shm2 ⁽¹⁾	Serina hidroximetiltransferasa citosolica	+++			
Shm2 ⁽²⁾		+++	++		
Ssb1 ^{(1) (2) (3)}	Proteína de choque térmico Ssb1	+++	+++	++	
Ssc1+Tif3 ^b	Proteína de choque térmico Ssc1 + Factor de iniciación de la traslación 4B	+++		+++	+++
Ssc1 ^{(1) (2)}	Proteína de choque térmico Ssc1	+++		+++	+++
Sse1 ^{(1) (2)}	Proteína de choque térmico Sse1	+++			
Ssz1	Proteína de choque térmico Ssz1	+++	+++		
Stm1	Proteína supresora de Tom1	±			
Tdh1 ⁽¹⁾	Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa 1	+++	+++		+
Tdh1 ^{(2) (3)}		+++	+++		
Tdh1+Gcy1 ^a	Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa 1 + Proteína aldo-keto reductasa	+++	+++		
Tdh1+Tef1 ^a	Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa 1 + Factor de elongación 1	+++	+++		
Tdh2 ^{(1) (3)}	Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa 2	+++	+++		
Tdh2 ⁽²⁾		++	+++		
Tdh2+Pgk1 ^a	Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa 2 + 3-Fosfoglicerato kinasa	+++	+++		±

Tabla 6. Continuación

Nombre	Descripción	ICR D14 t=15	ICR D14 t=30	ICR W303 t=15	ICR W303 t=30
Tdh3 ^{(1) (2) (4)}	Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa 3	+++	+++		+++
Tdh3 ^{(3) (5) (6) (7)}		+++	+++		±
Tdh3 ⁽⁸⁾		+++			+++
Tdh3 ⁽⁹⁾		+++			
Tdh3 ^{(10) (14)}		++	+++		
Tdh3 ⁽¹¹⁾					+++
Tdh3 ^{(12) (13)}		+++	+++		
Tef1 ^{(1) (2) (3)}	Factor de elongación 1			+++	
Tef1 ⁽⁴⁾			+		
Yhb1 ⁽¹⁾	Flavohemoglobina involucrada en la desintoxicación de óxido nítrico	+++			
Yhb1 ⁽²⁾		++			
YNL134C+Pdc1 ^a	Proteína no caracterizada YNL134C + Piruvato descarboxilasa 1	++			

^a manchas proteicas identificadas como una mezcla de proteínas, por lo que la inmunorreactividad puede ser debida a una sola de las proteínas. ⁽¹⁾⁻⁽¹⁴⁾ corresponden a diferentes manchas proteicas de una misma proteína.

(figura 24 D). La mayoría de estas proteínas inmunogénicas son proteínas clasificadas como metabólicas en la SGD, tales como Adh1, Tdh1, Tdh2, Tdh3, Cdc19, Pdc1, Atp1, Eno1 y Eno2, y también destacan chaperonas como Ssc1, Hsp60, Sse1, Ssz1 y Ssb1. La tabla 6 resume las diferencias encontradas en el patrón de reconocimiento de antígenos de *S. cerevisiae* y en ella se puede observar que existe un mayor número de proteínas inmunogénicas reconocidas por los sueros de ratones infectados con la cepa virulenta D14 en relación con la cepa avirulenta W303 y una baja coincidencia entre estos dos grupos de proteínas inmunogénicas.

El análisis de estos resultados mediante un diagrama de Venn (figura 26) muestra cuales son las proteínas inmunogénicas coincidentes y diferenciales frente a los sueros de ratones ICR a 15 días post-infección entre ambas cepas.

En el caso de los sueros de los ratones inmunodeprimidos la inmunorreactividad de las proteínas fue muy baja; de hecho únicamente utilizando más tiempo de exposición al revelar se pudo detectar alguna proteína inmunorreactiva. En estas condiciones sólo se observó de forma clara una proteína inmunogénica diferente con respecto al suero de ratones sin infectar (tiempo 0), que se identificó como Hsp60 y se detectó con el suero obtenido frente a la cepa D14 tras 15 días de infección (figura 27). Esta proteína se detectó también en sueros de ratones inmunocompetentes infectados con esta cepa.

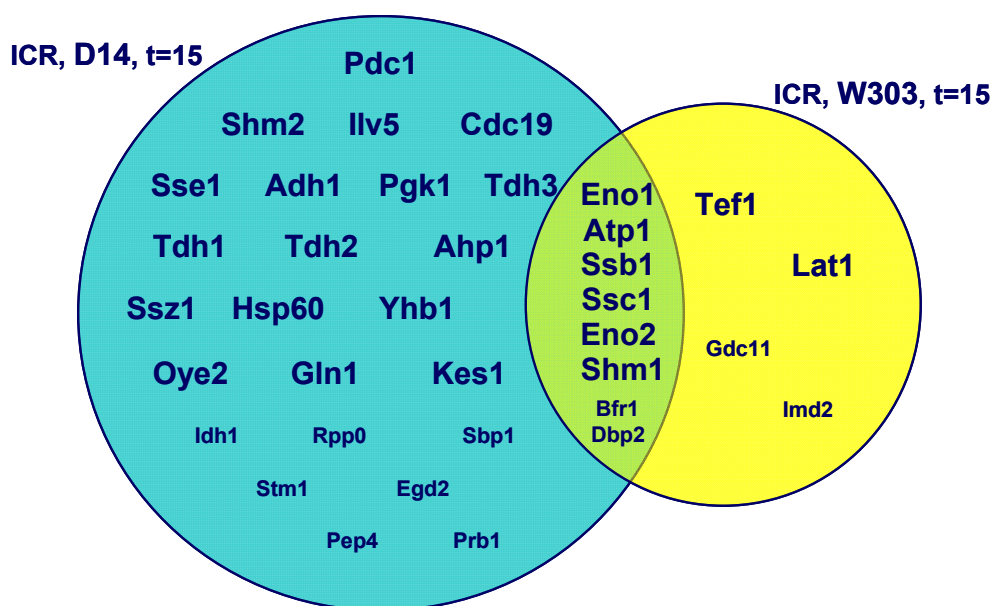


Figura 26. Diagrama de Venn en el que se muestran las proteínas inmunogénicas frente a sueros de ratones ICR a tiempo 15 días post-infección de las cepas D14 (fondo azul) y W303 (fondo amarillo) de *S. cerevisiae*.

Tamaño de letra grande: Intensidad de señal elevada en la inmunodetección. Tamaño de letra pequeño: Intensidad de señal baja en la inmunodetección.

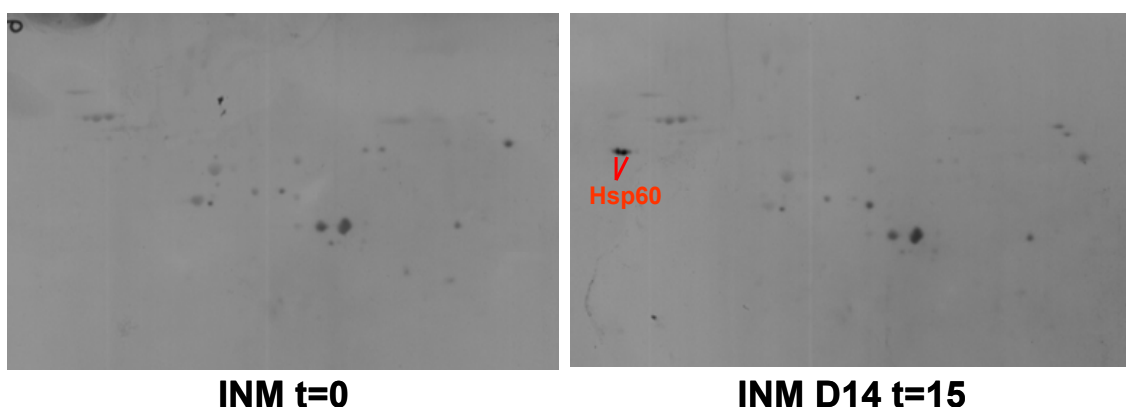


Figura 27. Análisis mediante *Western blotting* de las proteínas inmunorreactivas de *S. cerevisiae* frente a los sueros de ratones ICR/Swiss inmunodeprimidos antes de infectar y tras 15 días post-infección. Las imágenes que se muestran son representativas de los dos análisis realizados de cada condición.

Tiempo de exposición durante el revelado: 5 min.

2.3. Inmunorreactividad de los sueros con proteínas de *C. albicans*.

Con el objetivo de ver si existía inmunorreactividad cruzada en los sueros frente a las proteínas de *C. albicans*, se obtuvieron extractos proteicos totales de *C. albicans* SC5314, se separaron mediante electroforesis bidimensional 2D-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se utilizaron para la detección de las proteínas inmunorreactivas. En este caso, se utilizaron los sueros "ICR no

infectado", "ICR D14 15 días" y "ICR W303 15 días" y fueron ensayados dos veces en membranas diferentes.

Se detectaron grandes diferencias en la inmunorreactividad dependiendo de la cepa de *S. cerevisiae* inyectada para obtener los sueros, como puede verse en la figura 28B y en la tabla 7. Al igual que se describe en el apartado anterior, se detectó un mayor número de manchas proteicas inmunorreactivas con el suero de ratones infectados con la cepa D14 que con el de ratones infectados con la cepa

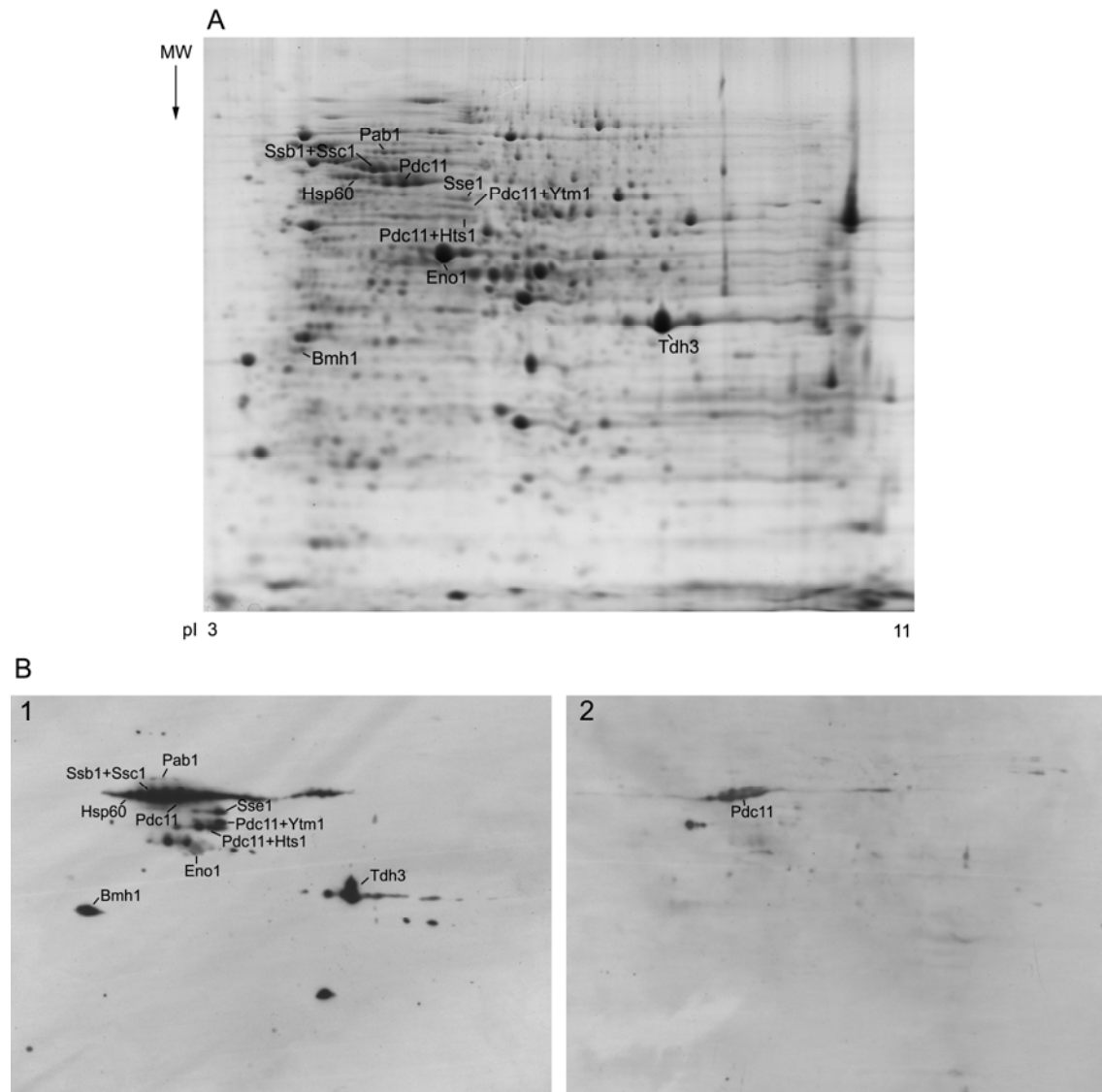


Figura 28. A. Gel 2D-PAGE teñido con Coomassie coloidal realizado a partir de extractos proteicos totales de la cepa SC5314 de *C. albicans*. Todas las proteínas detectadas e identificadas en las diferentes membranas se indican en sus posiciones correspondientes. B. 2D-Western blots realizados en una membrana con extracto proteico de *C. albicans* y con suero de ratones ICR tras 15 días post-infección con la cepa D14 (B1) y con la cepa W303 (B2). Las imágenes que se muestran son representativas de los dos análisis realizados de cada condición.

Tiempo de exposición durante el revelado: 1 min.

Tabla 7. Diferencias en el perfil de reconocimiento de antígenos de *C. albicans* por los sueros de ratones ICR tras 15 días post-infección con la cepa D14 o con la cepa W303.

Nombre	Descripción	ICR D14 t=15	ICR W303 t=15
Bmh1	Proteína con un dominio 14-3-3	+++	
Eno1	Enolasa 1	+	
Hsp60	Proteína de choque térmico 60	+++	
Pab1	Proteína de unión a la cola poli(A)	+	
Pdc11	Piruvato descarboxilasa	+++	++
Pdc11+Hts1 ^a	Piruvato descarboxilasa + tRNA-His sintetasa	++	
Pdc11+Ytm1 ^a	Piruvato descarboxilasa + Proteína asociada a microtúbulos	++	
Ssb1+Ssc1 ^a	Proteína de choque térmico Ssb1 + Proteína de choque térmico Ssc1	+++	
Sse1	Proteína de choque térmico Sse1	++	
Tdh3	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	+++	

^a manchas proteicas identificadas como una mezcla de proteínas, por lo que la inmunorreactividad puede ser debida a una sola de las proteínas.

W303. Las manchas inmunogénicas detectadas en las membranas se correlacionaron con manchas de proteínas de los geles teñidos con Coomassie (figura 28A) y se identificaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF utilizando la base de datos Swiss CGD 21. La información referente a estas identificaciones se muestra en el anexo I, tabla 2.

Con el suero de ratones ICR tras 15 días post-infección con la cepa D14 se identificaron once proteínas (figura 28 B1) mientras que con el suero de ratones ICR tras 15 días post-infección con la cepa W303 sólo se identificó una (figura 28 B2). En las inmunodetecciones realizadas con los sueros de ratones no infectados no se detectó ninguna señal.

Estos resultados muestran que los sueros de ratón infectados con *S. cerevisiae* fueron capaces de reconocer algunas proteínas de *C. albicans* lo que indica que existe cierta inmunorreactividad cruzada entre estas dos especies. De las 11 proteínas de *C. albicans* reconocidas por los sueros de *S. cerevisiae*, 6 de ellas han sido descritas como inmunogénicas en esta especie (Eno1, Pdc11, Ssb1, Ssc1, Sse1, Tdh3) (Pitarch y col., 2004).

3. Estudio de interacción con sangre de las cepas D14 y W303 de *S. cerevisiae*.

Para continuar estudiando la interacción de diferentes cepas *S. cerevisiae* con el hospedador se decidió abordar un estudio proteómico de expresión diferencial de proteínas de las cepas D14 y W303 de *S. cerevisiae* en interacción con sangre

humana mediante la tecnología de marcaje fluorescente de proteínas 2D-DIGE. Se eligió la sangre debido a que la diseminación de la levadura en el torrente sanguíneo constituye una etapa esencial para el desarrollo de infección sistémica. Para realizar este estudio se eligió el ratio de $5 \cdot 10^7$ levaduras por ml de sangre basándonos en un trabajo anterior en el que se estudiaba la respuesta transcripcional de *C. albicans* tras su interacción con sangre (Fradin y col., 2003). Los tiempos a los que se recogieron las levaduras fueron 0, 1.5 y 3 horas tras la incubación con sangre.

3.1. Estudio de supervivencia en sangre.

Como paso previo al estudio proteómico de expresión diferencial y para estudiar en profundidad la interacción *S. cerevisiae*-sangre se realizaron ensayos de supervivencia en sangre y suero.

Los ensayos de supervivencia se realizaron mediante recuento de UFC a los diferentes tiempos de interacción y se consideró que el número de UFC a tiempo 0 era el 100% de supervivencia. Estos ensayos revelaron una mayor supervivencia en sangre de la cepa D14 frente a la W303 a 1.5 h (figura 29). Respecto a la supervivencia en suero, no se observó muerte en ninguna de las dos cepas por la incubación con suero activo.

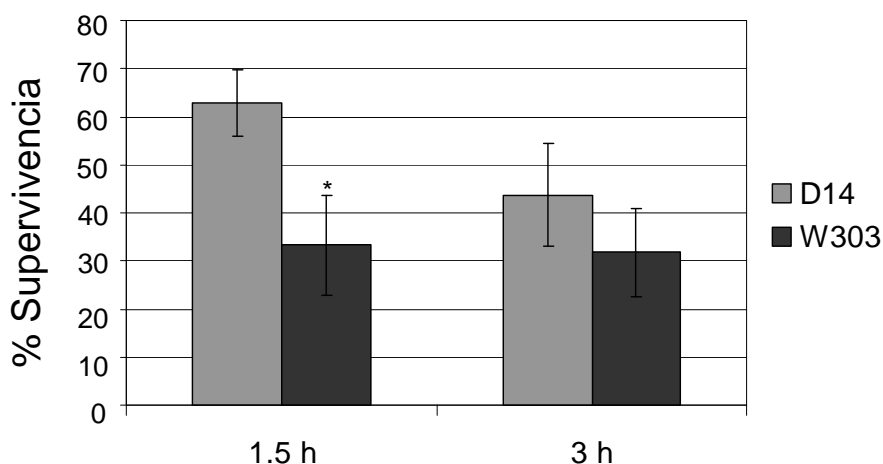


Figura 29. Porcentaje de supervivencia en sangre de las cepas D14 y W303 de *S. cerevisiae* a los tiempos de incubación 1.5 y 3 horas. Los datos representados son el promedio de tres experimentos diferentes y las barras de error representan la desviación estándar.

* El porcentaje de supervivencia es menor que el de *S. cerevisiae* D14 en las mismas condiciones con un $p\text{-value} < 0.05$.

3.2. Análisis proteómico de expresión diferencial mediante 2D-DIGE.

Para realizar el análisis proteómico de expresión diferencial se obtuvieron 3 réplicas biológicas (A, B y C) de cada una de las diferentes condiciones estudiadas, y tras obtener y cuantificar los extractos proteicos de las levaduras en interacción con sangre, se realizó el diseño experimental de los 9 geles del experimento (tabla 8). Según este diseño las diferentes muestras se marcaron con los fluorocromos Cy3 y Cy5 y se incluyeron de forma aleatoria en cada uno de los geles. El estándar interno (que consiste en una mezcla de todos los extractos proteicos) se marcó con Cy2 y se incluyó en los 9 geles del experimento.

Tras el marcaje y separación de los extractos proteicos mediante 2D-PAGE, los geles de DIGE se visualizaron en un escáner Typhoon 9400TM (figura 30) y se analizaron mediante el *software* DeCyder. Se detectaron 2.297 proteínas, que se analizaron con el módulo BVA de este programa para obtener las proteínas de expresión diferencial entre las diferentes condiciones ensayadas, considerándose proteína de expresión diferencial aquella que estuviera presente en un 75% de las imágenes y tuviera una variación mínima del ratio de ± 1.3 con *p-value* menor de 0.05. Se utilizó un análisis estadístico T-test para las comparaciones entre dos condiciones y un análisis 2-ANOVA para las comparaciones entre múltiples condiciones.

Mediante el módulo EDA del *software* DeCyder se realizó un análisis de componentes principales (PCA) de las diferentes imágenes de los geles, los resultados obtenidos se muestran en la figura 31. Puede observarse que las muestras pertenecientes a la cepa D14 están agrupadas en la zona izquierda y las

Tabla 8. Diseño experimental de 2D-DIGE.

Cy3	Cy5	Cy2	GEL
W303, t=0, A	W303, t=1.5, A	Estándar interno	Gel 1
D14, t=0, A	W303, t=0, B	Estándar interno	Gel 2
W303, t=0, C	W303, t=3, A	Estándar interno	Gel 3
D14, t=1.5, A	D14, t=0, B	Estándar interno	Gel 4
D14, t=0, C	D14, t=3, A	Estándar interno	Gel 5
W303, t=1.5, B	W303, t=3, B	Estándar interno	Gel 6
D14, t=1.5, B	W303, t=1.5, C	Estándar interno	Gel 7
W303, t=3, C	D14, t=3, B	Estándar interno	Gel 8
D14, t=3, C	D14, t=1.5, C	Estándar interno	Gel 9

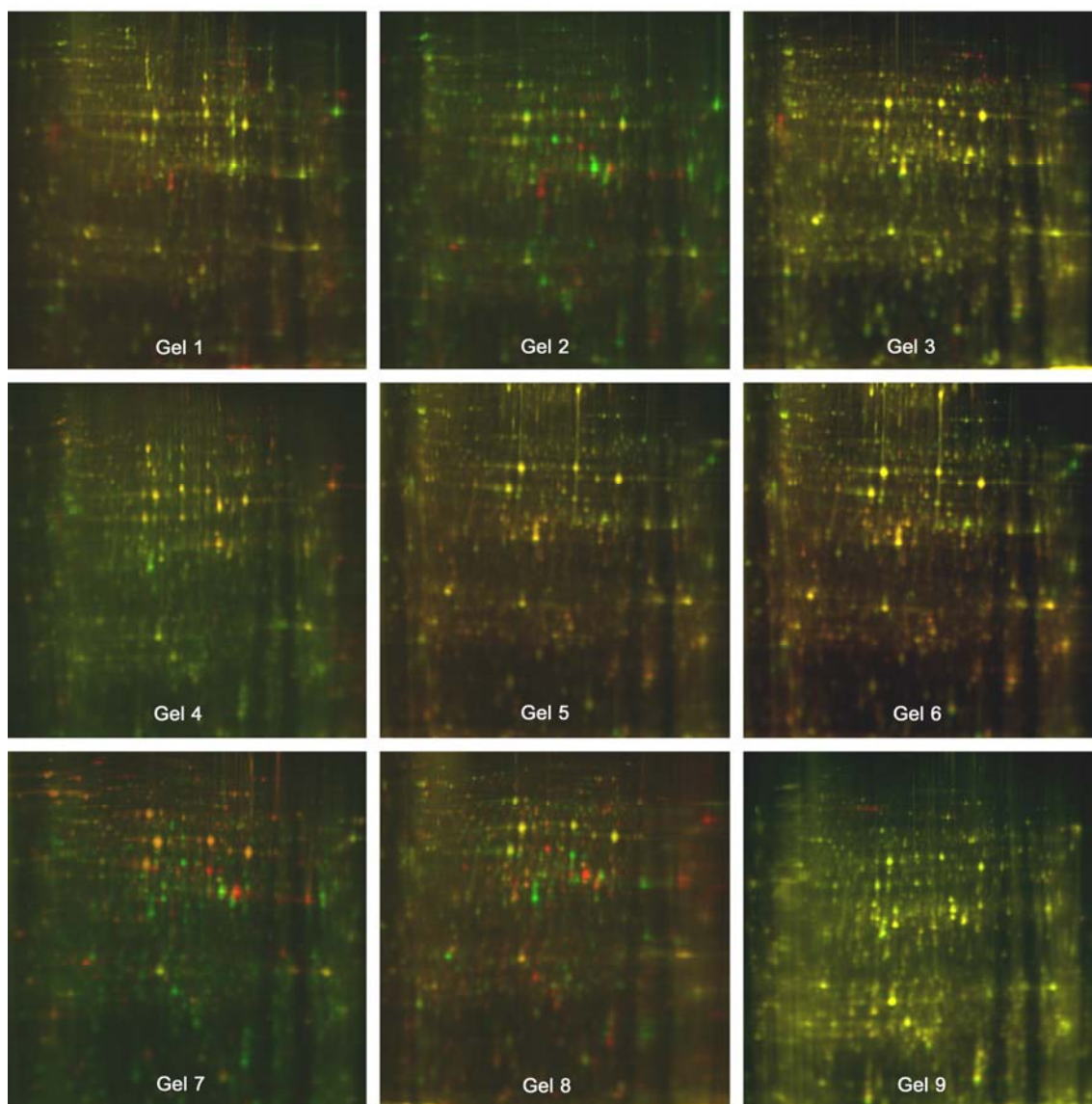


Figura 30. Imágenes de los geles bidimensionales correspondientes a extractos citoplasmáticos de las cepas D14 y W303 de *S. cerevisiae* tras su incubación con sangre, escaneados a distintas longitudes de onda según el fluorocromo. Cada gel muestra las imágenes correspondientes a los fluorocromos Cy3 y Cy5.

muestras pertenecientes a la cepa W303 están agrupadas en la zona derecha, viéndose que las muestras de cada una de las cepas se agruparon entre sí. Además, las muestras pertenecientes al tiempo cero de la cepa W303 se agruparon en la zona inferior separándose claramente de los tiempos 1.5 y 3 horas, mientras que en la cepa D14 esta separación no es clara.

Para la identificación de las proteínas de expresión diferencial se tiñeron los geles con el método de tinción con azul de Coomassie coloidal y se cortaron las manchas proteicas correspondientes a estas proteínas. Éstas fueron identificadas en la Unidad de Proteómica del PCM-UCM utilizando un espectrómetro de masas

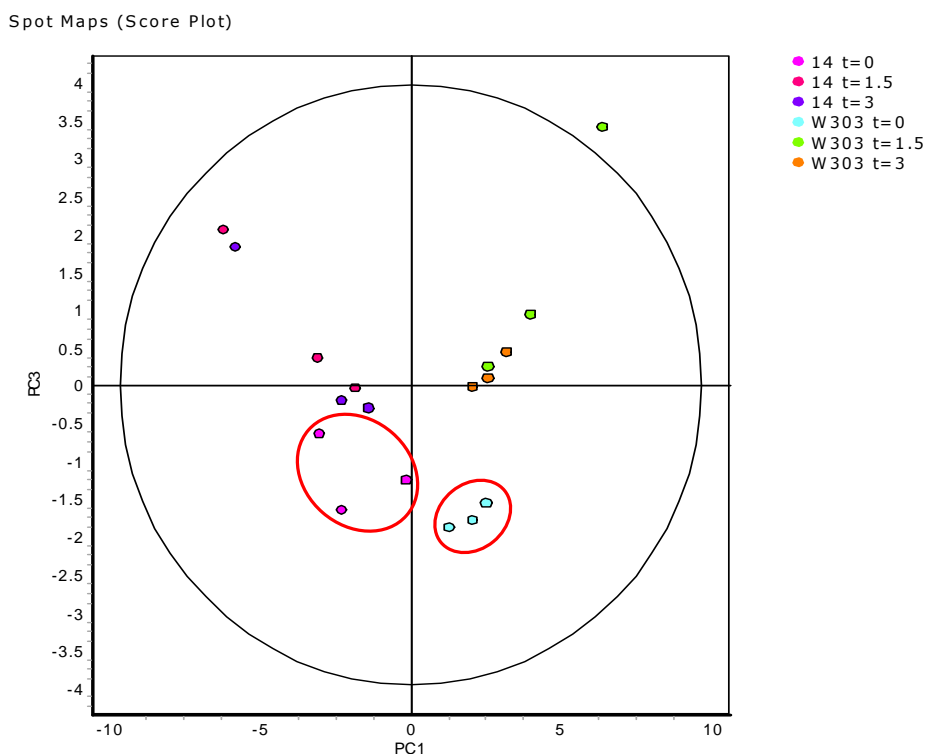


Figura 31. Análisis de PCA obtenido con el *software* DeCyder de las muestras indicadas en la figura. Con un círculo rojo se indican las muestras correspondientes a las cepas D14 (izquierda) y W303 (derecha) a tiempo 0 de incubación.

MALDI-TOF/TOF (AB Sciex) y el motor de búsqueda MASCOT en una base de datos no redundante que contenía entradas de SwissProt, utilizándose como organismos de referencia *S. cerevisiae* y *Homo sapiens*. Se incluyó como organismo de referencia *H. sapiens* debido a la posible unión de proteínas humanas a las levaduras durante la interacción.

3.2.1. Análisis proteómico diferencial entre las cepas D14 y W303 de *S. cerevisiae* a iguales tiempos de interacción con sangre.

Para la detección de las proteínas con variación de abundancia entre las dos cepas a los mismos tiempos de incubación se realizaron las siguientes comparaciones: D14 t=0 frente W303 t=0; D14 t=1.5h frente W303 t=1.5h; D14 t=3h frente W303 t=3h y se usó un análisis estadístico T-test. Las proteínas con variación de abundancia se identificaron mediante espectrometría de masas comprobándose que entre éstas había tanto proteínas de *S. cerevisiae* como humanas. Un resumen del número de manchas proteicas y proteínas obtenidas en estas comparaciones y del organismo al que pertenecen se muestra en la tabla 9. Las proteínas de *S. cerevisiae* y humanas identificadas se muestran en las tablas 10 y 11 respectivamente junto con el valor del ratio de la comparación. La información

Tabla 9. Número de proteínas de *S. cerevisiae* y humanas con variación de abundancia detectadas e identificadas en las comparaciones: D14 t=0/W303 t=0; D14 t=1.5/W303 t=1.5; D14 t=3/W303 t=3. En rojo aparecen las que aumentan su cantidad y en verde las que la disminuyen.

Comparación	Manchas proteicas detectadas	Manchas proteicas identificadas	Proteínas humanas identificadas		Proteínas de <i>S. cerevisiae</i> identificadas	
D14 t=0/ W303 t=0	113	74	1	0	23	29
D14 t=1.5/ W303 t=1.5	197	91	2	1	25	33
D14 t=3/ W303 t=3	265	89	1	1	32	30

suplementaria referente a las identificaciones de estas proteínas se muestra en el anexo I, tablas 3 y 4 y la referente al *p-value* de cada ratio en el anexo II, tablas 1 y 2.

Los resultados muestran que existen 53 proteínas con variación de abundancia entre las dos cepas a tiempo 0, lo que refleja las diferencias existentes entre las cepas y no las debidas a la incubación con sangre. La localización de las manchas proteicas identificadas en el gel de esta comparación se muestra en la figura 32.

Estas proteínas se analizaron mediante los programas Funspec y GENECODIS para realizar una evaluación estadística de la lista de proteínas identificadas respecto a anotaciones funcionales ya existentes en las bases de datos. De esta forma se puede conocer si dicha lista está enriquecida en proteínas incluidas en la misma categoría funcional. Se analizaron por un lado las proteínas que disminuían su cantidad y por otro las que la aumentaban. Las proteínas en las cuales se obtuvieron formas proteicas que aumentaban su cantidad y otras que disminuían no se incluyeron en el análisis. A continuación se hace referencia a las categorías funcionales con significancia estadística (*p-value*<0.01) que nos parecieron de mayor relevancia, los resultados de los análisis realizados con el programa Funspec se muestran en el anexo III. El conjunto de proteínas con disminución de cantidad en la cepa D14 respecto a la W303 reveló un enriquecimiento en proteínas implicadas en respuesta a estrés, respuesta a estrés oxidativo, procesos de oxido-reducción y biosíntesis de cisteína, mientras que el análisis de las proteínas con aumento de cantidad en la cepa D14 respecto a la W303 mostró un enriquecimiento en proteínas implicadas en la formación de hifas y en la biosíntesis de valina. En ambos grupos de proteínas se observó un enriquecimiento en proteínas metabólicas de procesos como la glucolisis y la gluconeogénesis.

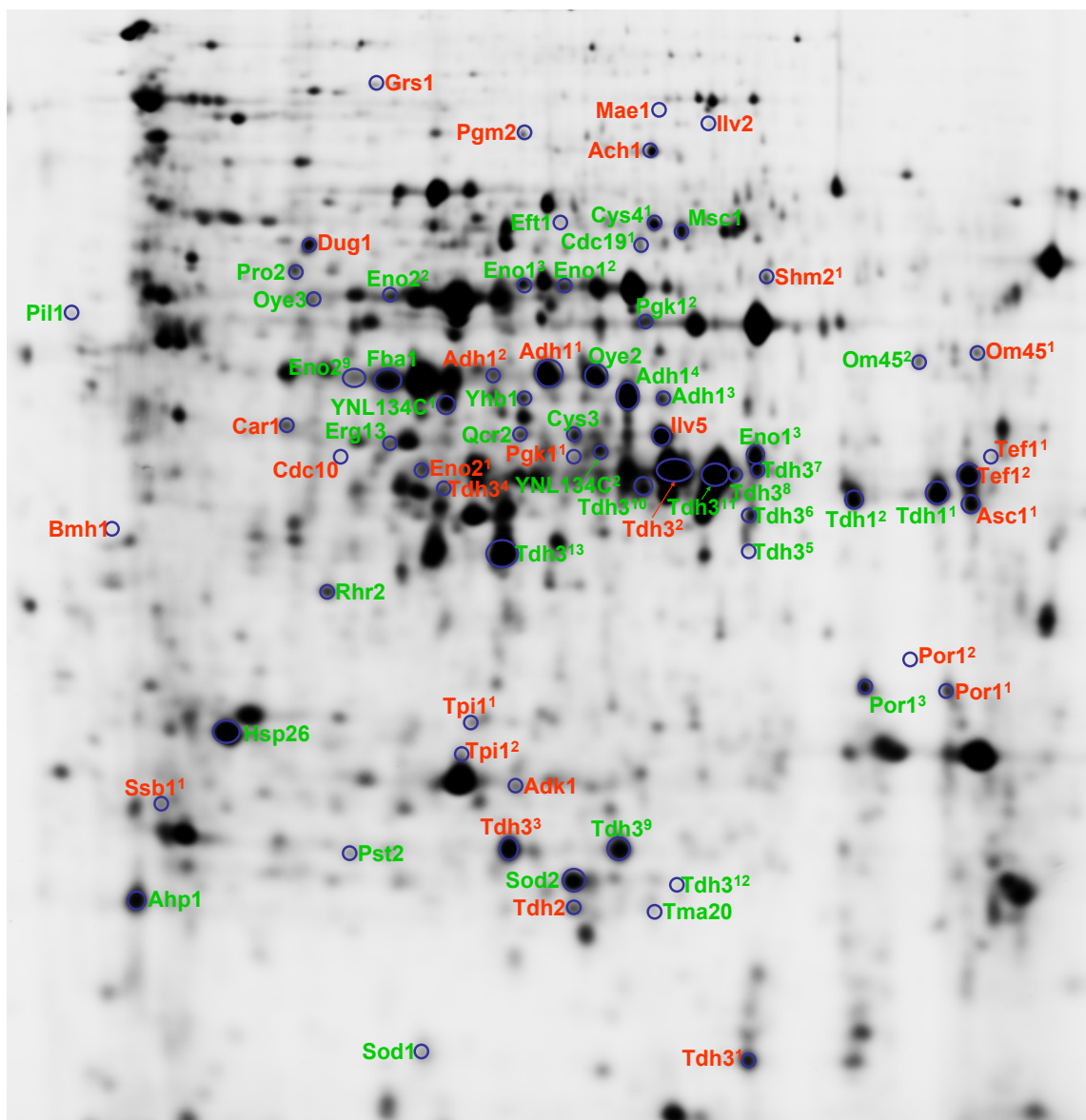


Figura 32. Imagen obtenida del software DeCyder de un gel 2D-DIGE del estándar interno donde se muestran las proteínas con diferencia de abundancia entre las cepas D14 y W303 a t=0h.

¹⁻⁷ corresponden a las diferentes manchas proteicas de la misma proteína. Las manchas proteicas identificadas con un aumento o disminución de ratio y significación estadística se han marcado en rojo y en verde respectivamente.

Respecto a las proteínas relacionadas con la respuesta a estrés más abundantes en la cepa W303, Yhb1, Pst2, Oye2, Oye3, Sod1, Sod2 y Ahp1 están relacionadas con la respuesta a estrés oxidativo, Ssb1, Pil1, Hsp26, Sod1 y Sod2 con la respuesta a estrés térmico, Hsp26 y Rhr2 con la respuesta a estrés osmótico e Yhb1 con la respuesta a estrés nitrosativo.

Respecto a las proteínas relacionadas con la formación de hifas más abundantes en la cepa D14, Ach1 y Bmh1 están relacionadas con el crecimiento pseudohifal y Asc1 con el crecimiento invasivo y la adhesión.

Se analizaron las proteínas con variación de abundancia entre las dos cepas a 1.5 h de interacción con sangre y también las obtenidas a tiempo 3 h (tablas 10 y 11). Obtuvimos que la mayoría de ellas eran las mismas que las obtenidas entre las proteínas con variación de abundancia a tiempo 0 y que un pequeño grupo de estas proteínas no se habían identificado a tiempo 0, en concreto 12 a 1.5 h de interacción y 13 a 3 h. Para el análisis funcional de estas proteínas se volvieron a usar los programas Funspec y GENECODIS (Anexo III), volviendo a obtenerse enriquecimiento en proteínas implicadas en respuesta a estrés, respuesta a estrés oxidativo, procesos de oxido-reducción y biosíntesis de cisteína entre las que estaban disminuidas en D14 y pseudofilamentación entre las aumentadas. Además, el análisis reveló enriquecimiento en proteínas implicadas el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en el plegamiento y estabilización de proteínas y en biosíntesis del glicerol entre las proteínas que disminuyen y en citoquinesis entre las que aumentan.

En este análisis, se identificaron también varias proteínas humanas relacionadas con la respuesta inmune y con la cascada de coagulación (tabla 11). Se han encontrado dos proteínas del sistema del complemento, C3 y el factor B. C3b es la fracción de C3 que se une a la superficie de patógenos y el factor B se une a ésta en la ruta alternativa de activación del sistema del complemento, pudiéndose encontrar así estas dos proteínas en la superficie de la levadura. Destaca que el factor B aparece con menor cantidad en la cepa D14 que en la W303 a tiempo 1.5h de incubación. De la misma forma una de las formas proteicas de la proteína C3 del complemento también aparece con menor cantidad en la cepa D14 a tiempo 1.5h de incubación, mientras que, a tiempo 3h, otra de las formas proteicas de esta misma proteína aparece aumentada en la cepa D14. Respecto al fibrinógeno, aparece con menor cantidad en la cepa D14 a tiempo 3h.

3.2.2. Análisis proteómico diferencial de las cepas D14 y W303 de *S. cerevisiae* a lo largo de su interacción con sangre.

Para identificar las proteínas de cada cepa que varían como consecuencia de la incubación con sangre se realizaron comparaciones entre los siguientes grupos de muestras: D14 t=0h frente D14 t=1.5h; D14 t=0h frente D14 t=3h; W303 t=0h frente W303 t=1.5h y W303 t=0h frente W303 t=3h y se usó un análisis estadístico T-test. Aquellas manchas proteicas que variaban su abundancia relativa fueron identificadas por espectrometría de masas. Un resumen del número de manchas proteicas y de las proteínas identificadas en cada comparación se muestra en la tabla 12. En esta tabla puede observarse que en todas las comparaciones se identificaron tanto proteínas de *S. cerevisiae* como humanas, y que en la cepa

Tabla 10. Proteínas de *S. cerevisiae* que en el análisis proteómico de interacción con sangre aumentan o disminuyen su abundancia en las distintas comparaciones que se muestran en la tabla.

Comparación		D14-0/ W303-0	D14-1.5/ W303-1.5	D14-3/ W303-3	D14-1.5/ D14-0	D14-3/ D14-0	W303-1.5/ W303-0	W303-3/ W303-0	2-ANOVA- tiempo	2-ANOVA- cepa/tiempo
Nombre	Descripción	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	p-value	p-value
METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS										
Pgm2	Fosfoglucomutasa 2	2.05								
Glucolisis y gluconeogénesis										
Cdc19 ¹	Piruvato kinasa 1	-3.26	-5.09							
Cdc19 ²			-3.32				3.59		0.045	0.018
Cdc19 ³				2.22				-2.09		
Cdc19 ⁴			-1.36	-1.74						
Eno1 ¹	Enolasa 1	-1.71	-2.4							
Eno1 ²		-1.72	-2.61							
Eno1 ³		-1.82								0.025
Eno1 ⁴									0.047	
Eno1 ⁵			-2.75							
Eno1 ⁶			-2.84							
Eno1 ⁷			-3.41	-2.1						
Eno1 ⁸				-5.17						
Eno2 ¹	Enolasa 2	2.46		1.89						
Eno2 ²		-1.61	-3.07							
Eno2 ³			2.11	1.75			-2.05	-1.61	0.0076	0.04
Eno2 ⁴			5.24				-3.98		0.041	0.017
Eno2 ⁵								-1.36		
Eno2 ⁶			4.46	3.25				-1.78		
Eno2 ⁷										0.039
Eno2 ⁸			1.82							0.024
Eno2 ⁹		-2.12		-3.52						
Eno2 ¹⁰			-2.34							
Eno2 ¹¹			2.27	1.5						
Eno2 ¹²				1.64						
Fba1	Fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa 1	-1.99								

Tabla 10. Continuación.

Comparación		D14-0/ W303-0	D14-1.5/ W303-1.5	D14-3/ W303-3	D14-1.5/ D14-0	D14-3/ D14-0	W303-1.5/ W303-0	W303-3/ W303-0	2-ANOVA- tiempo	2-ANOVA- cepa/tiempo
Nombre	Descripción	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	p-value	p-value
Gpm1	Glicerato fosfomutasa			-1.9						
Mae1	Enzima málica mitocondrial	2.74								
Pgk1 ¹	3-Fosfoglicerato kinasa	2.12	1.37		-1.84				0.017	
Pgk1 ²		-2.41	-4.57							
Pgk1 ³							-1.72	-1.49		
Pgk1 ⁴										0.0091
Pgk1 ⁵			2.06	1.77						
Pgk1 ⁶			-2.66							
Tdh1 ¹	Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenada 1	-7.98	-7.03	-4.26						
Tdh1 ²		-8.89	-10.58	-13.51						
Tdh2	Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenada 2	4.12	5.15	4.45						
Tdh3 ¹	Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa 3	17.85	45.53	12.08						
Tdh3 ²		16.9		17.05						
Tdh3 ³		10.47	26.83	16.81						
Tdh3 ⁴		3.08	6.26	2.58						
Tdh3 ⁵		-1.62			1.39					0.033
Tdh3 ⁶		-2.56						-1.95		
Tdh3 ⁷		-3.26	-6.38	-2.09	-1.37					
Tdh3 ⁸		-3.84	-3.38	-2.42						
Tdh3 ⁹		-4.02		-2.43						
Tdh3 ¹⁰		-4.47	-6.72	-10.54						
Tdh3 ¹¹		-4.72	-10.87	-3.85						
Tdh3 ¹²		-7.44		-4.01						
Tdh3 ¹³		-20.01	-19.65	-45.2						
Tdh3 ¹⁴										0.032
Tdh3 ¹⁵			4.89							
Tpi1 ¹	Triosa fosfato isomerasa	4.93	4.47	3.9						
Tpi1 ²		1.84		1.96						

Tabla 10. Continuación.

Comparación		D14-0/ W303-0	D14-1.5/ W303-1.5	D14-3/ W303-3	D14-1.5/ D14-0	D14-3/ D14-0	W303-1.5/ W303-0	W303-3/ W303-0	2-ANOVA- tiempo	2-ANOVA- cepa/tiempo
Nombre	Descripción	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	p-value	p-value
Fermentación										
Adh1 ¹	Alcohol deshidrogenasa 1	9.01	6	7.55						
Adh1 ²		3.13								
Adh1 ³		-4.71	-7.98	-4.23	-1.37					
Adh1 ⁴		-13.46	-23.52	-26.02						
Adh1 ⁵			-4.04		-2.28					0.033
Adh1 ⁶			4.38	2.49	2.68				0.01	
Adh1 ⁷			-3.15	-2.43						
Pdc1 ¹	Piruvato descarboxilasa 1		-1.81				1.36			0.019
Pdc1 ²			4.87	2.54			-2.91			0.02
Pdc1 ³			4.01	2.06				-1.42		0.037
Pdc1 ⁴			-3.36							
Ruta de los ácidos tricarboxílicos										
Cit1	Citrato sintasa		2.4	1.85	2.81	2.06			0.033	0.0032
Mdh1	Malato deshidrogenasa		-2.7							
Sdh1	Subunidad de la succinato deshidrogenasa		-2.38				2.06			0.015
Síntesis de glicerol										
Rhr2	DL-glicerol fosfato fosfatasa	-1.86	-2.61	-2.19						
Metabolismo de aminoácidos y bases nitrogenadas										
Ade1	N-succinil-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribótido sintetasa		2.16	1.84						
Adk1	Adenilato kinasa	3.18	5.22	2.79						
Car1	Arginasa	3.92	2.44	4.07						
Cys3	Cistationina gamma-liasa 3	-1.66	-3.87	-2.49						
Cys4 ¹	Cistationina beta-sintasea 4	-2.86	-3.9	-2.99						
Cys4 ²	Cistationina beta-sintasea 4		-4.17	-4.37				4.4		
Ilv2	Acetolactato sintasa	2.08					1.71			
Ilv5	Ácido quetol reductoisomerasa	2.21		1.79						
Imd2	Inosina monofosfato deshidrogenasa						1.97	1.44	0.0029	

Tabla 10. Continuación.

Comparación		D14-0/ W303-0	D14-1.5/ W303-1.5	D14-3/ W303-3	D14-1.5/ D14-0	D14-3/ D14-0	W303-1.5/ W303-0	W303-3/ W303-0	2-ANOVA- tiempo	2-ANOVA- cepa/tiempo
Nombre	Descripción	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	p-value	p-value
Imd3	Inosina monofosfato deshidrogenasa		-3.89							
Pro2	Gamma-glutamyl fosfato reductasa	-1.43								
Shm2 ¹	Serina hidroximetiltransferasa	3.52								
Shm2 ²			2.77							0.047
RESPUESTA A ESTRÉS										
Ahp1	Alkil hidroperóxido reductasa 1	-2.04	-2.44	-2.14						
Hsp26	Proteína de choque térmico de 26 kDa	-18.07	-21.4	-16.1						
Oye2	NADPH deshidrogenasa	-2.99								
Oye3	NADPH deshidrogenasa	-2.52	-4.13	-2.29						
Pil1	Proteína asociada a la membrana plasmática implicada en la biogénesis del eisosoma	-1.43	-1.69	-1.76		-1.38			0.011	
Pst2	Proteína secretada por protoplastos	-4.88	-1.98	-4.94			-1.43			0.022
Sod1	Superóxido dismutasa 1	-2.99		-2.04			-1.49			
Sod2	Superóxido dismutasa 2	-1.66		-1.64						
Ssa1 ¹	ATPasa, proteína de choque térmico de la familia Hsp70		-1.58	-1.55	-1.5				0.004	
Ssa1 ²				1.79			-1.42	-1.61		0.0025
Ssa1 ³							1.61			
Ssa1 ⁴									0.0022	0.022
Ssb1 ¹	ATPasa, proteína de choque térmico de la familia Hsp70	2.46	4.34	2.05					0.027	0.013
Ssb1 ²			2.74	1.76		1.61				0.0057
Ssb1 ³			-3.35							0.042
Ssc1	ATPasa, proteína de choque térmico de la familia Hsp70		-6.69	-3.77						
Yhb1	Flavohemoglobina involucrada en la desintoxicación de óxido nítrico	-2.87	-9.17	-4						
SÍNTESIS DE PROTEÍNAS										
Eft1	Factor de elongación de la traducción EF-2	-1.58	-3.9	-2.86			1.39	1.46		
Hyp2	Factor de iniciación de la traducción			2.26				-2.36		

Tabla 10. Continuación.

Comparación		D14-0/ W303-0	D14-1.5/ W303-1.5	D14-3/ W303-3	D14-1.5/ D14-0	D14-3/ D14-0	W303-1.5/ W303-0	W303-3/ W303-0	2-ANOVA- tiempo	2-ANOVA- cepa/tiempo
Nombre	Descripción	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	p-value	p-value
Rps5	Proteína ribosómica de la subunidad pequeña			6						
Tef1 ¹	Factor de elongación de la traducción	2.84	3.28	2.61						
Tef1 ²		2.29	4.04	4.56						
Tef2 ¹	Factor de elongación de la traducción							-13.76		
Tef2 ²	Factor de elongación de la traducción			12.07						
Tif3	Factor de iniciación de la traducción		1.34				-1.49	-1.3	0.0094	
TRANSPORTE CELULAR										
Atp1	ATP sintasa		2.69	3.11						0.039
Atp3	ATP sintasa						1.98		0.0082	0.035
Qcr2	Ubiquinol-citocromo C reductasa 2	-3.11	-4.3	-2.67						
Por1 ¹	Porina 1	3.55	2.29	2.14						
Por1 ²		1.49								
Por1 ³		-5.35	-7.71	-6.82						
Por1 ⁴			5.06		1.91					0.03
Por1 ⁵							-1.53	-1.5	0.048	
CRECIMIENTO FILAMENTOSO										
Ach1	Acetil-CoA hidrolasa	1.84		1.76						
Asc1 ¹	Proteína ribosomal de la subunidad 40S	3.08	4.04	4.1			-1.32			
Asc1 ²							1.85			
Asc1 ³			3.65	2.15						0.029
Bmh1	Proteína de la familia 14-3-3	1.7				-1.54		1.75		0.005
OTRAS PROTEÍNAS										
Act1	Actina		1.76				-1.84			
Bfr1	Proteína que suprime brefeldina A		2.18	4.95			-1.61	-3.35	0.023	0.04
Cdc10	Proteína del anillo de septinas	1.91	1.79	2.07			-1.53		0.0022	
Dld3	D-lactato deshidrogenasa		-3.44							
Dug1	Cys-Gly metalo-di-peptidasa	2.33								
Egd1	Proteína potenciadora de la unión Gal4-ADN			2.3			-1.39	-1.96		0.014

Tabla 10. Continuación.

Comparación		D14-0/ W303-0	D14-1.5/ W303-1.5	D14-3/ W303-3	D14-1.5/ D14-0	D14-3/ D14-0	W303-1.5/ W303-0	W303-3/ W303-0	2-ANOVA- tiempo	2-ANOVA- cepa/tiempo
Nombre	Descripción	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	p-value	p-value
Erg13	3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A sintasa	-1.76	-2.09	-2.33						
Grs1	Glicil-tRNA sintetasa	1.95		2.91						
Npl3	Proteína de unión al ARN			1.31						
Wtm1	Modulador de la transcripción implicado en la regulación de la meiosis							-1.59		
Zuo1	Chaperona asociada a los ribosomas			2.33				-2.04		
PROTEÍNAS DE FUNCIÓN DESCONOCIDA										
Msc1	Proteína de función desconocida	-7.24	-7.15	-6.24				-1.42		
Om45 ¹	Proteína de membrana mitocondrial externa de 45 kDa	4.48	6.26	5.86						
Om45 ²		-3.64	-3.26	-2.86						
Pet10	Proteína de función desconocida						-1.36	-1.47	0.0055	
Tma20	Proteína asociada a las ribosomas	-2.59		-3.05						
YNL134C ¹	Proteína de función desconocida	-2.47	-5.66	-3.83						
YNL134C ²		-3.3		-2.68					0.021	
MEZCLAS DE PROTEÍNAS										
Cdc19+Tdh1 ^a	Piruvato kinasa 1 + Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa 1			-3.22						
Eno2+Act1 ^a	Enolasa 2 + Actina		-4.42	-3.89						
Hxk2+Hxk1 ^a	Hexokinasa 1 + Hexokinasa 2			2.12						
Pdc1+Eno1 ^a	Piruvato descarboxilasa 1 + Enolasa 1		2.04							
Pgk1+Cit1 ^a	3-Fosfoglicerato kinasa + Citrato sintasa		-3.15							
Tef4+Pgk1 ^a	Factor de elongación de la traducción + 3-Fosfoglicerato kinasa			1.81				-1.63		

Las manchas proteicas con un aumento o disminución de ratio de ± 0.3 y significación estadística ($p\text{-value} < 0.05$) se han marcado con celdas en rojo y verde respectivamente y se ha incluido el valor del ratio. En los análisis 2-ANOVA las manchas proteicas con significación estadística ($p\text{-value} < 0.05$) se han marcado con celdas en azul y se ha incluido su $p\text{-value}$. ^a manchas proteicas identificadas como una mezcla de proteínas; ¹⁻¹⁵ corresponden a las diferentes manchas proteicas de la misma proteína.

Tabla 11. Proteínas humanas que en el análisis proteómico de interacción con sangre aumentan o disminuyen su abundancia en las distintas comparaciones que se muestran en la tabla.

Comparación		D14-0/ W303-0	D14-1.5/ W303-1.5	D14-3/ W303-3	D14-1.5/ D14-0	D14-3/ D14-0	W303-1.5/ W303-0	W303-3/ W303-0	2-ANOVA- tiempo
Nombre	Descripción	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	p-value
SISTEMA DEL COMPLEMENTO									
C3 ¹	Proteína C3 del complemento				6.92	5.33	18.16	4.49	0.00015
C3 ²							16.41	4.58	0.00035
C3 ³							9.15	3.66	0.0015
C3 ⁴					2.6	2.2	2.62		0.00028
C3 ⁵				1.42	3.27	2.66	4.51	2.78	1.30E-05
C3 ⁶			-1.33		7.79	6.91	10.8		5.90E-07
CFB	Factor B del complemento		-4.16				5.86		0.0075
CFP ¹	Properdina				6.73	5.48	13.34	11.25	5.20E-08
CFP ²							5.94		0.019
OTRAS PROTEÍNAS									
FGB	Fibrinogeno			-1.99		1.67			0.0097
IGHG1	Región C de la IgG1	1.64	2.85		3.37	2.15			0.00076

Para una mejor visualización de los resultados en los análisis mediante t-test, las manchas proteicas con un aumento o disminución de ratio de ± 0.3 y significancia estadística ($p\text{-value} < 0.05$) se han marcado con celdas en rojo y verde respectivamente y se ha incluido el valor del ratio. En los análisis 2-ANOVA las manchas proteicas con significancia estadística ($p\text{-value} < 0.05$) se han marcado con celdas en azul y se ha incluido su $p\text{-value}$. ¹⁻⁶ corresponden a las diferentes manchas proteicas de la misma proteína.

Tabla 12. Número de proteínas de *S. cerevisiae* y humanas que varían su abundancia en las cepas D14 y W303 a lo largo del tiempo. En rojo aparece el número de proteínas que aumentan su cantidad y en verde el de las que disminuyen.

Comparación	Manchas proteicas detectadas	Manchas proteicas identificadas	Proteínas humanas identificadas	Proteínas de <i>S. cerevisiae</i> identificadas	
D14 t=1.5/ D14 t=0	28	15	3	4	4
D14 t=3/ D14 t=0	17	11	4	2	2
W303 t=1.5/ W303 t=0	51	32	3	8	14
W303 t=3/ W303 t=0	81	29	2	4	17
2-ANOVA- tiempo	45	30	5	17	
2-ANOVA- cepa/tiempo	41	29	0	20	

W303 se han detectado un mayor número de proteínas que varían su abundancia que en la cepa D14.

La localización en el gel de las proteínas identificadas que varían su abundancia en las distintas comparaciones realizadas se muestran en las figuras 33 y 34; todas las proteínas identificadas junto con su ratio de variación en cada comparación se muestran en las tablas 10 y 11 y la información adicional se muestra en el anexo I,

tablas 4 y 5 y anexo II, tablas 3 y 4.

Las proteínas con variación de abundancia se analizaron mediante los programas Funspec y GENECODIS, pero al ser un número tan bajo de proteínas en cada comparación no se obtuvieron resultados significativos.

Entre las proteínas metabólicas que mostraron variación de abundancia a lo largo del experimento se observó la disminución de varias formas proteicas de la proteína glicolítica Eno2 en la cepa W303. Respecto a las proteínas del metabolismo de los ácidos tricarboxílicos, la proteína Cit1 aumentó como consecuencia de la incubación con sangre en la cepa D14 (proteína compartida entre el ciclo del glioxilato y el de los ácidos tricarboxílicos), mientras que la proteína Sdh1 (del ciclo de los ácidos tricarboxílicos) aumentó en la cepa W303. Varias proteínas del metabolismo de aminoácidos aumentaron su cantidad en la cepa W303 a lo largo del tiempo, Cys4 e Ilv2. Encontramos varias proteínas relacionadas con el estrés disminuidas en la cepa W303 como consecuencia de la incubación con sangre, Pst2 y Sod1. En la cepa D14 disminuyó la proteína Pil1, implicada en la biogénesis de los eisosomas. Bmh1, proteína implicada en la regulación de muchos procesos, como exocitosis, transporte de vesículas y señalización por MAPKs, disminuyó en D14 y aumentó en W303. Otras proteínas cuya cantidad disminuyó en la cepa W303 en presencia de sangre son Act1 (actina), Bfr1 (proteína que suprime brefeldina A), Cdc10 (proteína del anillo de gemación), Egd1 (proteína potenciadora de la unión Gal4-ADN), Wtm1 (modulador de la transcripción implicado en la regulación de la meiosis) y Zuo1 (Chaperona asociada a los ribosomas); además, Imd2, proteína que cataliza un paso limitante en la biosíntesis del GTP, aumentó en dicha cepa. Respecto a las proteínas Pet10 y Msc1 de función desconocida disminuyeron su cantidad en la cepa W303 con la interacción con sangre.

Respecto a las proteínas humanas identificadas hay que destacar que todas las muestras se sometieron al mismo proceso de limpieza y todas ellas estuvieron en contacto con la sangre. En el tiempo 0 se pusieron las levaduras con la sangre e inmediatamente se procesó la muestra, por ello el aumento de cantidad en las proteínas humanas identificadas a los tiempos de incubación 1.5 y 3 h respecto al tiempo 0 nos indica que las proteínas se han unido a la superficie de la levadura como consecuencia de este tiempo de interacción con sangre. Se han encontrado dos proteínas del sistema del complemento aumentadas a lo largo de la incubación con sangre en ambas cepas, C3 y la properdina; la properdina, al igual que el factor B, se une a C3b por la ruta alternativa del sistema del complemento, encontrándose así estas tres proteínas en la superficie de la levadura. Además, el factor B está aumentado en la cepa W303 y el fibrinógeno en la cepa D14.

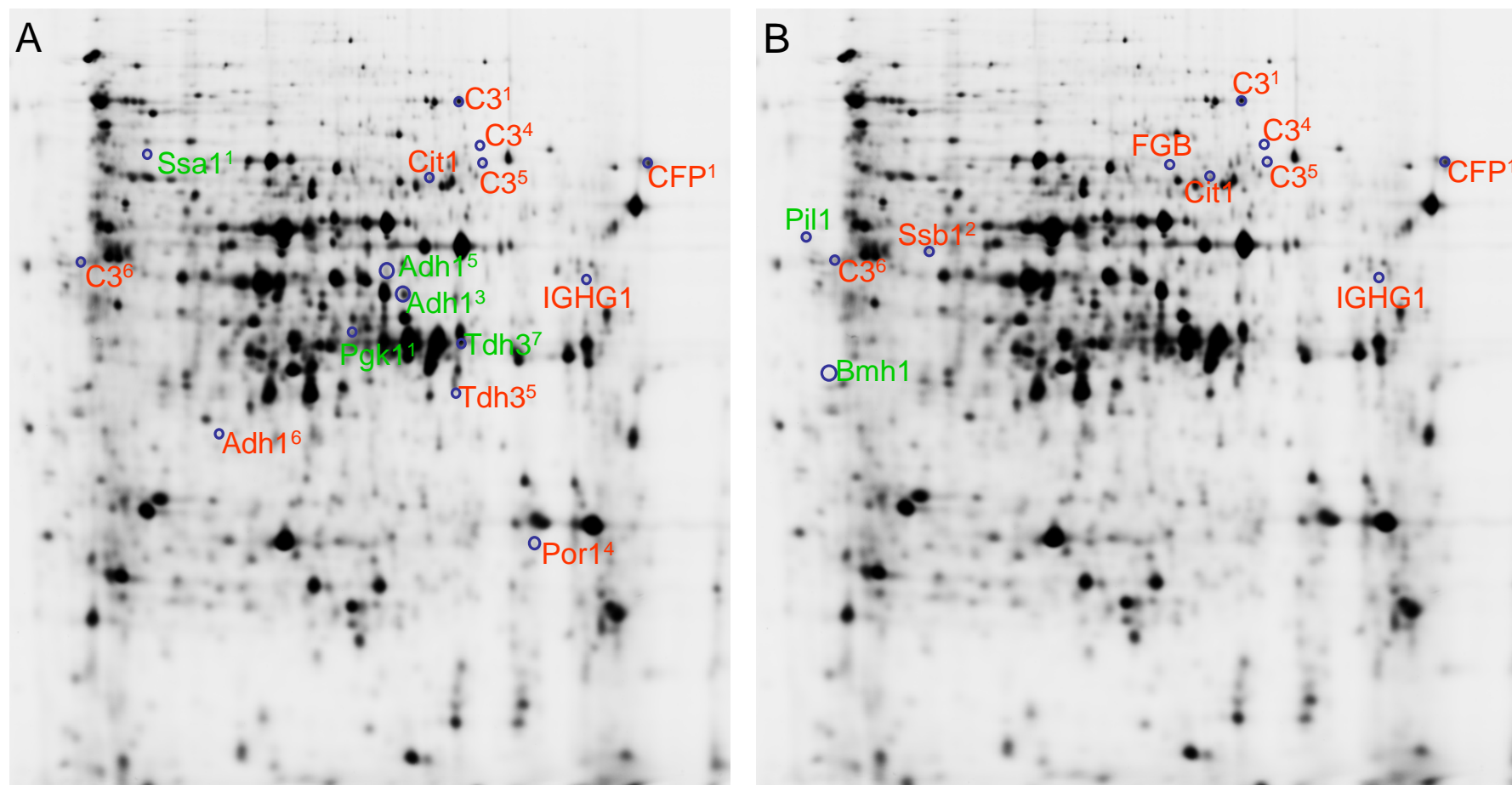


Figura 33. Imagen obtenida del *software* DeCyder de un gel 2D-DIGE del estándar interno donde se muestran las manchas proteicas con diferencia de abundancia significativa en la cepa D14 a lo largo del tiempo. Comparaciones: A. D14 t=1.5 h/D14 t=0; B. D14 t=3 h/D14 t=0.

¹⁻⁷ corresponden a las diferentes manchas proteicas de la misma proteína. Las manchas proteicas identificadas con un aumento o disminución de ratio y significación estadística se han marcado en rojo y en verde respectivamente.

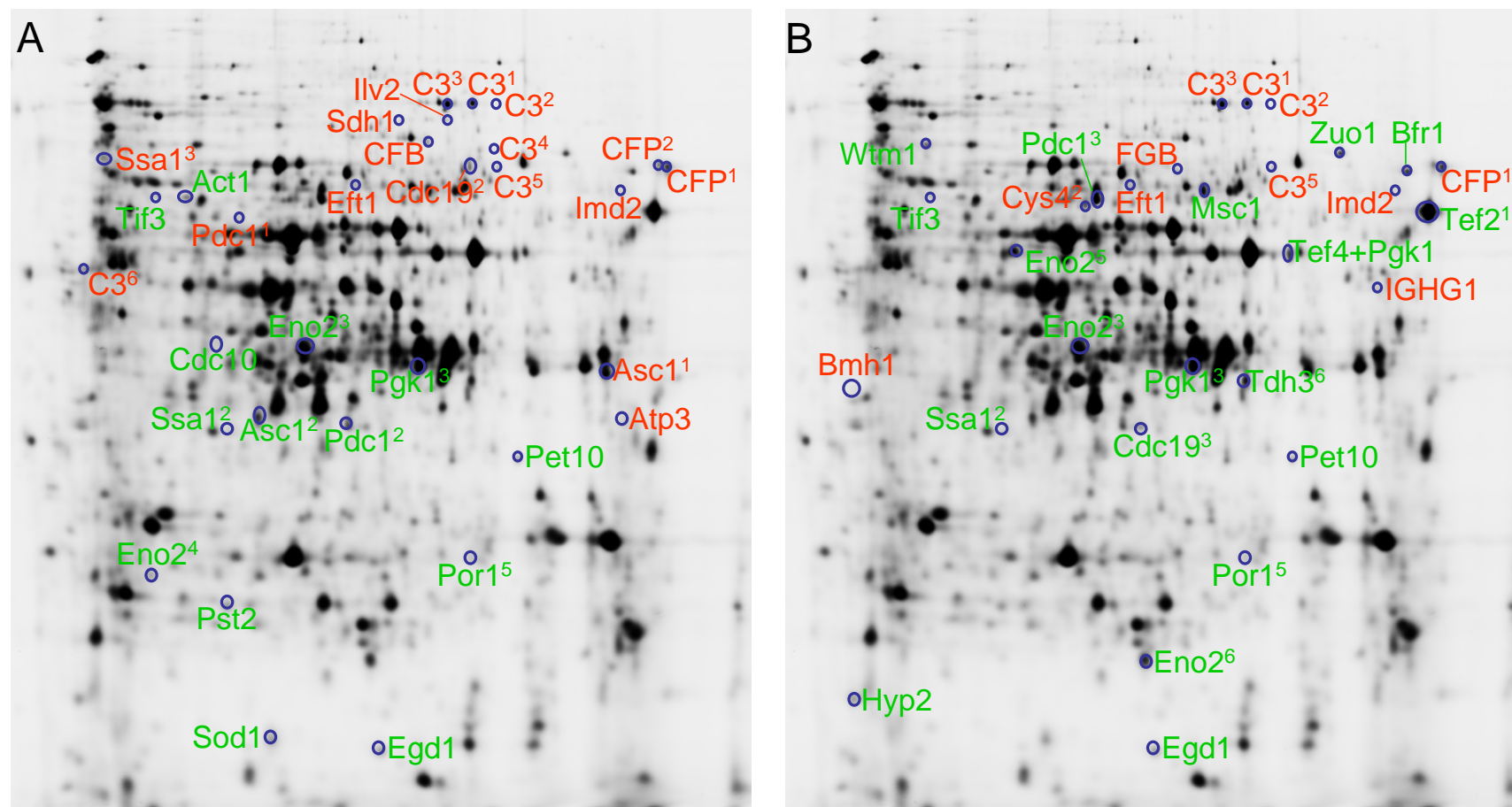


Figura 34. Imagen obtenida del *software* DeCyder de un gel 2D-DIGE del estándar interno donde se muestran las manchas proteicas con diferencia de abundancia significativa en la cepa W303 a lo largo del tiempo. Comparaciones: A. W303 t=1.5 h/W303 t=0; B. W303 t=3 h/W303 t=0.

¹⁻⁶ corresponden a las diferentes manchas proteicas de la misma proteína. Las manchas proteicas identificadas con un aumento o disminución de ratio y significación estadística se han marcado en rojo y en verde respectivamente.

Además, de las comparaciones realizadas usando un análisis estadístico T-test entre las cepas y de cada una de ellas a distintos tiempos (comparaciones de dos condiciones), realizamos comparaciones de todas las condiciones entre sí, obteniendo de esta forma el comportamiento de las proteínas en ambas cepas como consecuencia de la incubación con sangre a lo largo del tiempo. Para determinar cuales eran las proteínas con un cambio de abundancia significativo, se usaron dos análisis estadísticos 2-ANOVA, uno en función de la variable tiempo (2-ANOVA-tiempo) y otro en función de las variables tiempo y cepa (2-ANOVA- cepa/tiempo). Las formas proteicas y las proteínas identificadas en estas comparaciones se muestran en las tablas 10, 11 y 12 y la información adicional referente a las identificaciones en el anexo I, tablas 4 y 5. Las gráficas que representan en cada proteína la cinética de la variación de la cantidad en cada cepa a lo largo del tiempo se muestran en el anexo IV.

Las proteínas de *S. cerevisiae* que varían en función del tiempo y de la cepa son las que se comportan de una forma diferente en la cepa virulenta y en la avirulenta ante la incubación con sangre, donde sometemos a las levaduras a circunstancias similares a las de la diseminación por el torrente sanguíneo (tabla 10, última columna). Dentro de este grupo, en la figura 35, se muestran distintas cinéticas de variación de abundancia de las proteínas que hemos considerado más interesantes. Se han identificado varias formas proteicas de Eno2 que se comportan de forma similar a lo largo de la interacción con sangre; varias proteínas el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, como Cit1 y Sdh1; la proteína Pst2, implicada en la respuesta a estrés oxidativo; la proteína Shm2 implicada en el metabolismo de aminoácidos; las ATPasas Atp1 y Atp3; y proteínas ya comentadas como Bmh1, Bfr1 y Egd1 (figura 35).

También hemos detectado proteínas que varían su abundancia sólo en función del tiempo, es decir varían de igual forma en ambas cepas a lo largo del tiempo como son Imd2, Cdc10 y las proteínas de función desconocida Pet10 e YNL134C (tabla 10, penúltima columna y anexo IV).

Respecto a las proteínas humanas que varían su abundancia en función del tiempo encontramos tres proteínas del sistema del complemento. En concreto seis formas proteicas de la proteína C3, el factor B del complemento y dos formas proteicas de la properdina (tabla 11, última columna y anexo IV). C3 y la properdina muestran un aumento de su cantidad a lo largo de la incubación en ambas cepas mientras que el factor B muestra un mayor aumento en la cepa W303 frente a la D14, la cinética de variación de abundancia de algunas de estas formas proteicas a lo largo del experimento se muestra en la figura 36. Otro dato de interés es que cinco de las formas proteicas de C3 muestran en su identificación mediante huella

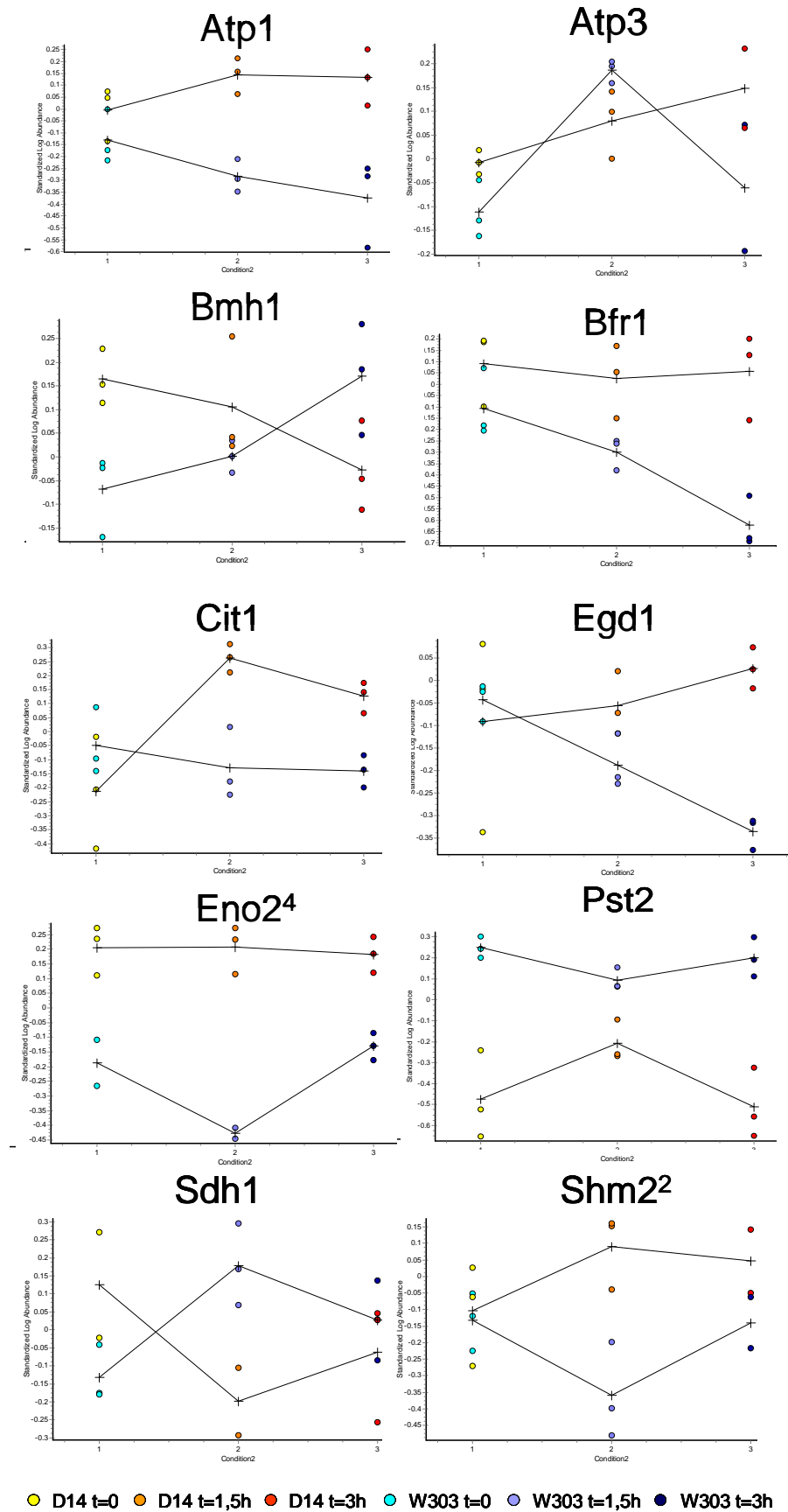


Figura 35. Gráficas que representan la cinética de la variación de abundancia de las proteínas indicadas en el análisis proteómico de interacción con sangre.

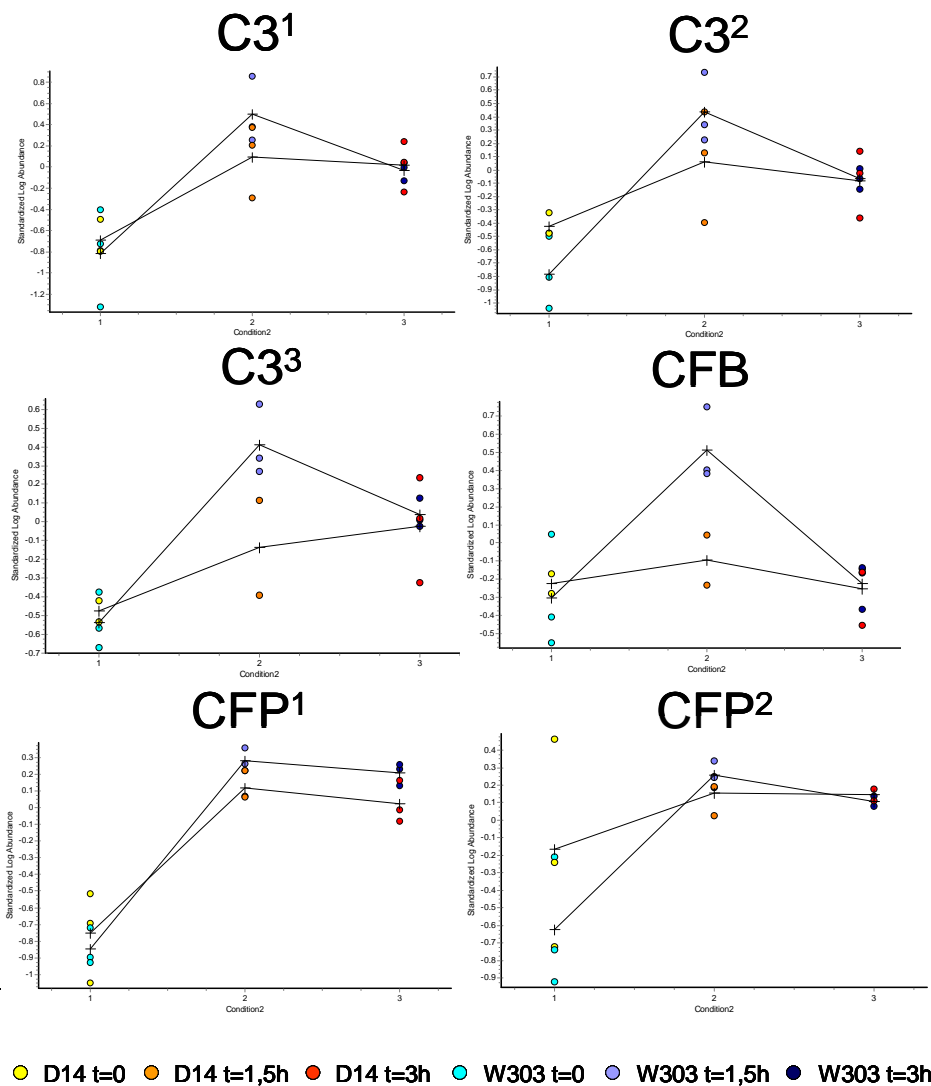


Figura 36. Gráficas que representan la cinética de la variación de abundancia de tres formas proteicas de la proteína C3 del complemento, del Factor B y de dos formas proteicas de la properdina en el análisis proteómico de interacción con sangre.

péptida que pertenecen a la cadena β de iC3b y una a la cadena α' , y las identificaciones mediante huella peptídica del factor B del complemento muestra péptidos de la fracción Bb de esta proteína, que es la fracción que se une a C3b.

3.3. Resistencia a diferentes tipos de estreses.

Al comparar las dos cepas a tiempo 0 de interacción con sangre se identificaron varias proteínas relacionadas con la respuesta a diferentes estreses (térmico, oxidativo, y osmótico) que estaban disminuidas en la cepa D14 respecto a la W303. Por ello se decidió hacer estudios de sensibilidad/resistencia a dichas condiciones adversas en estas dos cepas. En estos estudios se incluyeron también el resto de las

cepas aisladas de suplementos dietéticos y probióticos ya que el comportamiento frente al estrés oxidativo se ha descrito como un rasgo fenotípico con posible asociación a la virulencia.

Se determinó el crecimiento de las diferentes cepas en presencia de compuestos que provocan estrés oxidativo: H_2O_2 , diamida y menadiona.

El estudio de la resistencia a estrés oxidativo frente a H_2O_2 se realizó inicialmente mediante crecimiento a diferentes concentraciones de H_2O_2 (figura 37). Como puede verse en la figura 37 las cepas que resistieron mejor este estrés oxidativo fueron D5, D14 y 102 [todas ellas han mostrado virulencia en el modelo de ratón (Yáñez y col., 2009; de Llanos y col., 2011; Llopis, 2012)]. La cepa D2 presentó un crecimiento mayor que el de los controles (cepa de laboratorio W303 y cepa vínica 10431) pero menor que el de las cepas virulentas, mientras que las cepas D4, D6 y D23 se comportaron como las cepas control. Estos resultados fueron similares cuando se sometió a las células a un tratamiento con 100 mM de H_2O_2 a diferentes tiempos donde se observó la supervivencia mediante siembra en medio YPD (figura 38). Las cepas D14, D5 y 102 fueron las únicas capaces de crecer tras 60 minutos de incubación a esta concentración de H_2O_2 .

Respecto a la resistencia al daño oxidativo provocado por la diamida, la cepa que mejor creció en presencia de dicho compuesto fue la D14, seguida de la 10431. Las cepas D2, D6 y 102 crecieron peor que éstas pero mejor que la cepa control W303 (figura 39).

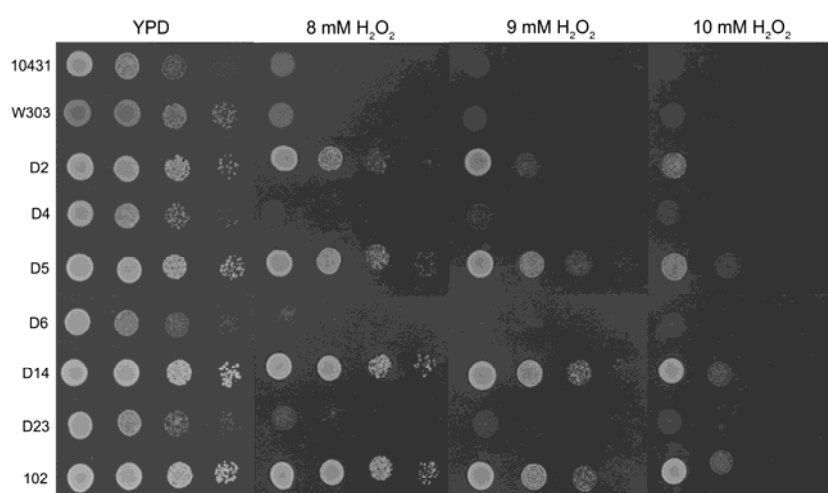


Figura 37. Crecimiento observado en YPD a 8, 9 y 10 mM de H_2O_2 de las cepas indicadas de *S. cerevisiae*.

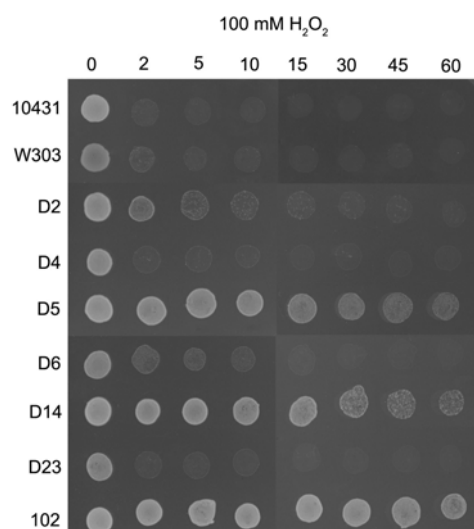


Figura 38. Crecimiento observado en YPD de las cepas indicadas de *S. cerevisiae* tras incubarlas con 100 mM de H_2O_2 a diferentes tiempos (de 0 a 60 minutos).

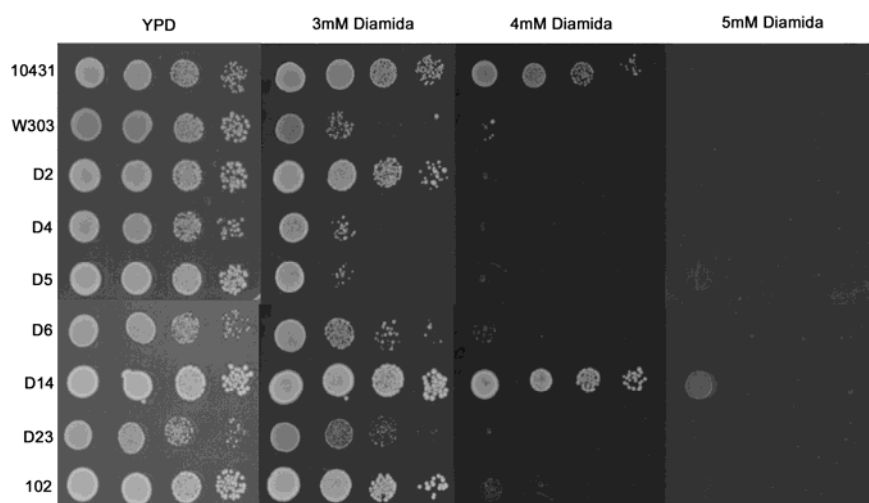


Figura 39. Crecimiento observado en YPD a 3, 4 y 5 mM de diamida de las cepas indicadas de *S. cerevisiae*.

En el caso de la respuesta al estrés oxidativo provocado por la menadiona, las cepas que mejor crecieron fueron D2, D4 y D23, las cepas D14 y 102 tuvieron un crecimiento intermedio y las cepas D5 y D6 un crecimiento bajo, comparable al de las cepas control (figura 40).

Estos datos muestran que las cepas con mayor resistencia al estrés oxidativo ensayado son la D14, la 102 y la D2 y la de menor la W303, existiendo diferencias según el tipo de compuesto generador de dicho estrés.

También se determinó el crecimiento de las diferentes cepas a diferentes compuestos que provocan un estrés osmótico: sorbitol (1.5 y 2 M), KCl (1 y 1.5 M) y NaCl (0.5 y 1 M).

Como puede verse en la figura 41 las cepas que crecieron mejor ante el estrés osmótico provocado por el sorbitol fueron D5, D14 y 102, y algo menos la D2, al igual que ocurrió con el tratamiento con H_2O_2 .

Cuando el estrés fue provocado por el KCl, las cepas D2, D5, D14 y 102 también fueron las que mejor crecieron a 1 M de KCl, si bien la cepa D2 no fue capaz de crecer a una concentración de 1.5 M de este compuesto, mientras que las otras tres cepas resistieron esta concentración (figura 42).

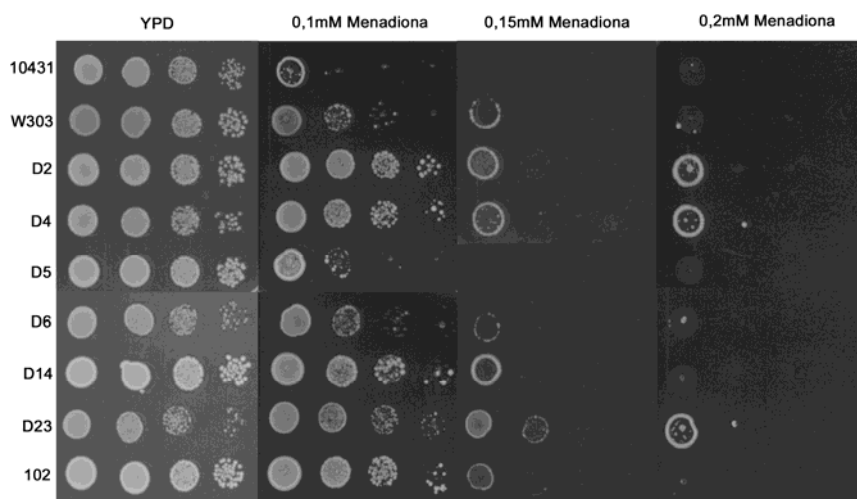


Figura 40. Crecimiento observado en YPD a 0.1, 0.15 y 0.2 M de menadiona de las cepas indicadas de *S. cerevisiae*.

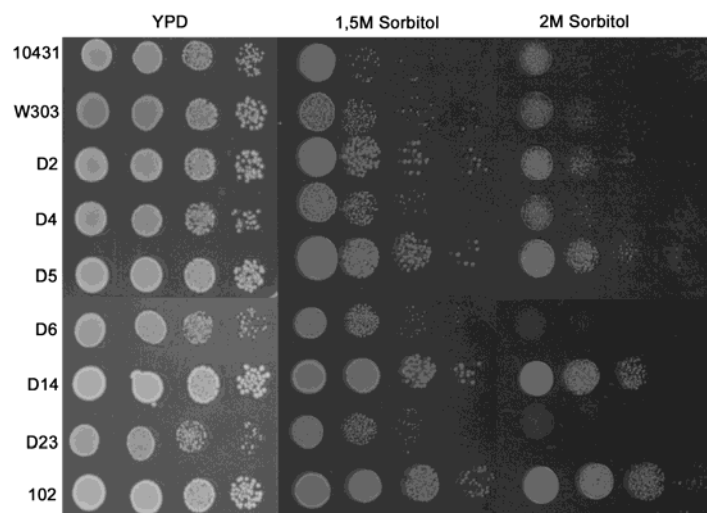


Figura 41. Crecimiento observado en YPD a 1.5 y 2 M de sorbitol de las cepas indicadas de *S. cerevisiae*.

En el caso del NaCl las cepas que mejor crecieron a 0.5 y 1 M fueron la D14 y la W303; las cepas D4 y 102 mostraron un crecimiento intermedio y las cepas 10431, D2, D5, D6 y D23 mostraron un crecimiento bajo ya en presencia de 0.5 M NaCl. Sólo las cepas D14, W303 y 102 fueron capaces de crecer a 1 M de NaCl (figura 43).

Estos datos muestran que las cepas con mayor resistencia al estrés osmótico ensayado son la D14 y la 102 y la de menor la D23.

Un resumen de los resultados obtenidos frente a los distintos tipos de estreses se muestra en la tabla 13.

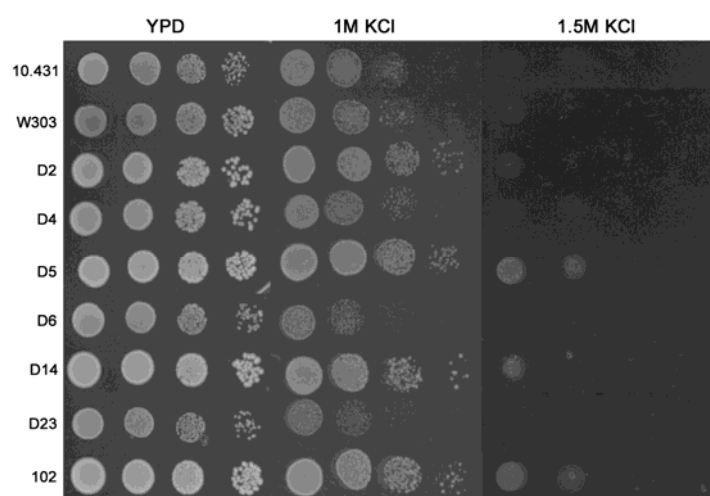


Figura 42. Crecimiento observado en YPD a 1 y 1.5 M de KCl de las cepas indicadas de *S. cerevisiae*.

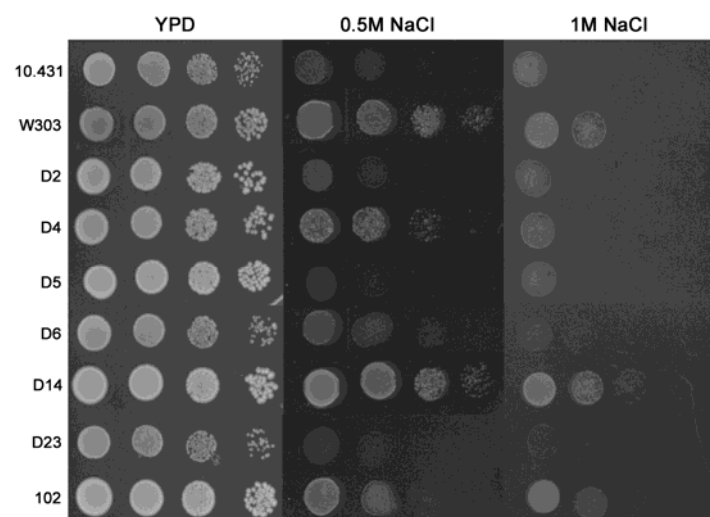


Figura 43. Crecimiento observado en YPD a 0.5 y 1 M de NaCl de las cepas indicadas de *S. cerevisiae*.

Tabla 13. Resumen de la resistencia a los diferentes tipos de estreses estudiados de las cepas aisladas de suplementos dietéticos, alimentos enriquecidos y probióticos (D2, D4, D5, D6, D14 y D23), del aislado clínico 102 y de cepas control 10431 y W303 de *S. cerevisiae*.

Cepa	Estrés oxidativo									Estrés osmótico					
	H ₂ O ₂			Diamida			Menadiona			Sorbitol		KCl		NaCl	
	8 mM	9 mM	10 mM	3 mM	4 mM	5 mM	0.1 mM	0.15 mM	0.2 mM	1,5 M	2 M	1 M	1.5 M	0.5 M	1 M
10431	±	-	-	+++	+++	-	±	-	-	+	±	++	-	+	±
W303	±	-	-	+	±	-	++	±	-	++	+	++	-	+++	+
D2	++	+	±	+++	-	-	+++	±	±	+++	+	+++	-	+	±
D4	-	-	-	+	-	-	+++	±	±	++	+	++	-	++	±
D5	+++	++	+	+	-	-	+	-	-	+++	++	+++	+	±	±
D6	±	-	-	+++	±	-	++	±	-	++	-	+	-	+	±
D14	+++	+++	+	+++	+++	±	+++	±	-	+++	++	+++	±	+++	++
D23	±	-	-	++	-	-	+++	+	±	++	-	+	-	±	-
102	+++	+++	+	+++	±	-	+++	±	-	+++	+++	+++	+	++	+

Se considera +++ cuando hay crecimiento hasta la última dilución, ++ cuando hay crecimiento en 2 diluciones, + cuando hay crecimiento en una dilución, ± cuando crece sin dilución y - cuando no crece.

4. Análisis del surfoma de la cepa D14 de *S. cerevisiae* tras su incubación con suero humano.

La pared celular fúngica juega un papel relevante en diferentes procesos vitales para la célula, puesto que asegura la protección de los elementos que contiene, soporta la presión osmótica, y a través de ella se producen todos los intercambios de nutrientes, así como la asimilación y salida de sustancias de desecho. Además, existen proteínas de superficie que están implicadas en importantes procesos biológicos como el reconocimiento celular, las rutas de transducción de señales y la interacción patógeno-hospedador, constituyendo estas proteínas los principales antígenos y moléculas de reconocimiento por parte del hospedador. Por ello, estas proteínas están directamente relacionadas con la adhesión, la modulación de la respuesta inmunitaria y la antigenicidad en hongos patógenos. Además, la superficie celular es una excelente diana para la búsqueda de nuevos antifúngicos.

Se realizó un estudio proteómico de las proteínas de superficie de la cepa D14 en incubación con suero humano durante tres horas. Esta estrategia está basada en la digestión directa de la superficie de la célula viva con tripsina, seguida de una separación cromatográfica de los péptidos obtenidos y su identificación por espectrometría de masas mediante trampa iónica *LTO Orbitrap*. Se utilizó el mismo procedimiento puesto a punto por Parra (2013). Un esquema del proceso de obtención de los péptidos tripticos se muestra en la figura 44.

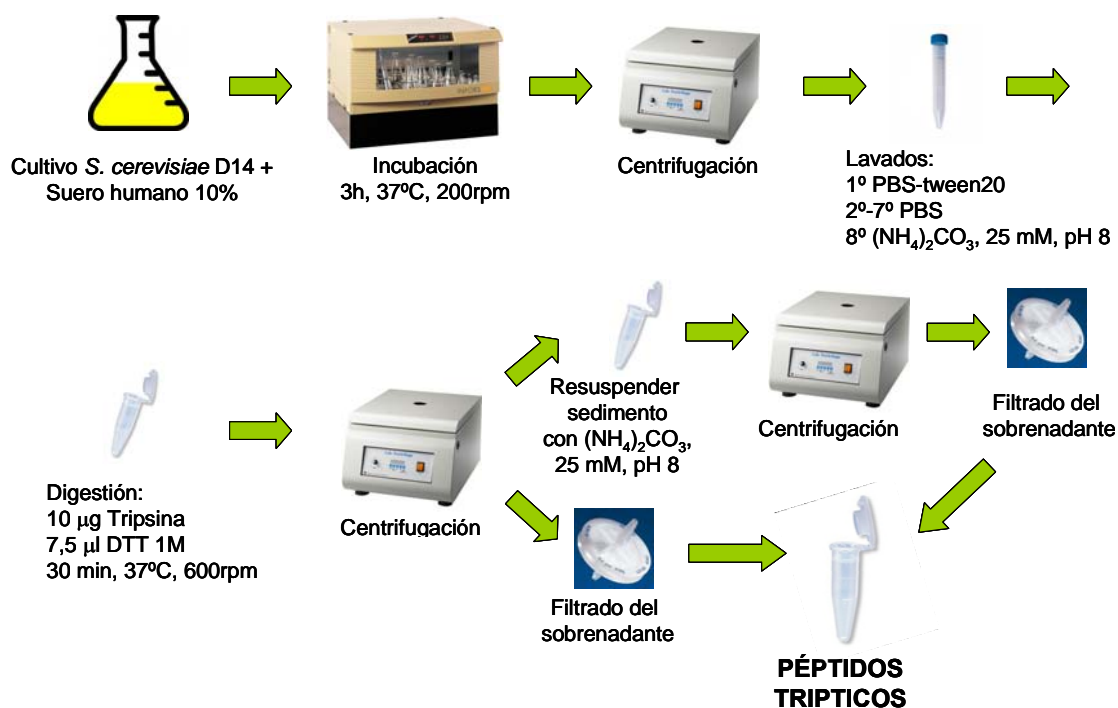


Figura 44. Esquema de trabajo seguido en la obtención de los péptidos de la superficie celular de *S. cerevisiae* digeridos directamente con tripsina.

Con el fin de comprobar que las células no se habían lisado durante la tripsinización de las muestras, lo que habría provocado la liberación del contenido citoplasmático al sobrenadante, se llevó a cabo un control de la lisis celular. Para ello, las células obtenidas antes y después de la incubación con tripsina se marcaron con yoduro de propidio y se analizaron mediante citometría de flujo. El yoduro de propidio es un fluorocromo que tiñe específicamente los ácidos nucleicos de la levadura, pero no es capaz de penetrar en las células a no ser que éstas hayan perdido su permeabilidad selectiva. De este modo, las células que emitan fluorescencia al ser irradiadas serán solamente las que hayan perdido la integridad celular (de la Fuente y col., 1992). El citómetro de flujo cuantifica de forma rápida y sencilla, el porcentaje de células yoduro de propidio positivas en una población celular. Los resultados confirmaron que más de un 99.5% de las células no tenían alterada su permeabilidad selectiva ni antes ni después de su incubación con tripsina, no mostrando además ninguna diferencia significativa debida al tratamiento proteolítico (figura 45).

Tras la identificación mediante espectrometría de masas de los péptidos correspondientes a tres réplicas biológicas del experimento, se seleccionaron aquellas proteínas cuyos péptidos aparecían al menos en dos réplicas y que estaban representadas con un mínimo de dos péptidos. Los resultados individuales de las proteínas identificadas en cada una de las réplicas biológicas se muestran en el material suplementario de la tesis. En la tabla 14 se muestra el número de proteínas identificadas en cada réplica y el número total de proteínas identificadas teniendo en cuenta el criterio anteriormente mencionado.

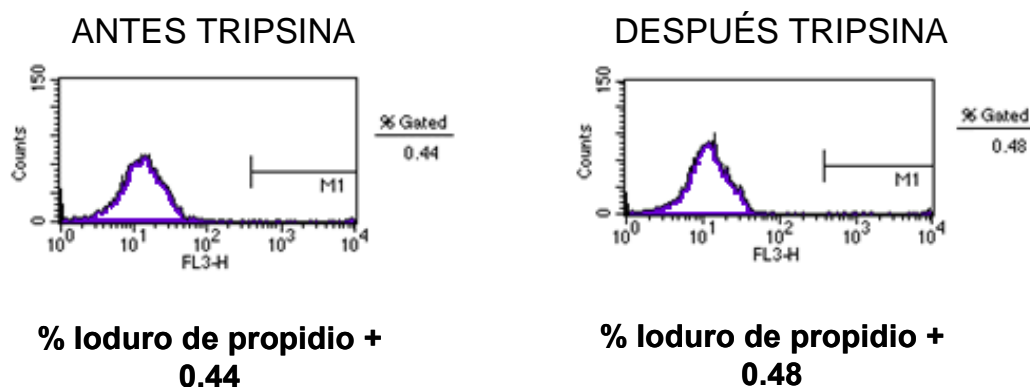


Figura 45. Citometría de flujo de las células tratadas con tripsina. La pérdida de permeabilidad se midió antes del tratamiento con tripsina y tras treinta minutos de tratamiento.

Tabla 14. Número de proteínas obtenidas mediante digestión directa con tripsina de la superficie celular de *S. cerevisiae* tras su incubación con suero humano e identificadas mediante espectrometría de masas.

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Nº proteínas identificadas
Nº Proteínas <i>S. cerevisiae</i>	314	380	358	202
Nº Proteínas humanas	191	48	112	74

En la tabla 15 se muestran estas proteínas de *S. cerevisiae*, clasificadas según su función biológica de acuerdo con varias bases de datos (SWISS-PROT, SGD y PROTEOME) y en la figura 46 el porcentaje de proteínas que pertenece a cada categoría. La información referente a las identificaciones de estas proteínas se muestra en el anexo V, tabla 1. La clasificación de estas proteínas de *S. cerevisiae* reveló un alto enriquecimiento en proteínas implicadas en la organización de la pared celular, respuesta a estrés y destino de proteínas (donde se encuentran las chaperonas), siendo mayoritarias las clasificadas como metabólicas (figura 46). De las 202 proteínas identificadas en la superficie celular de la cepa D14 de *S. cerevisiae*, muchas de ellas son típicas de la pared celular, 24 pertenecen a la categoría de organización de la pared celular (tabla 15), 11 son proteínas con anclaje GPI (Ecm33, Pst1, Crh1, Crh2/Utr2, Gas1, Gas3, Gas5, Eng1/Dse4, Cwp1, Yps2/Mkc7 e Yps3) (Caro y col., 1997) y 3 son proteínas PIR (Pir1, Pir2/Hsp150 y Pir4/Cis3). Algunas de ellas tienen una función estructural y estabilizadora de la pared, como las Pir (Mrsa y Tanner, 1999), y otras son enzimas implicadas en el procesamiento y remodelación del glucano: 6 glucanasas, Bgl2, Eng1/Dse4, Exg1, Scw4, Scw10 y Scw11 (Klis y col., 2006); 3 glucanosil-transferasas de la familia GAS, Gas1, Gas3 y Gas5 (Mouyna y col., 2000; Ragni y col., 2007); y 2 quitina transglicosidasas implicadas en el ensamblaje entre glucano y quitina, Crh1 y Crh2/Utr2 (Cabib y col., 2007; Cabib y col., 2008). También hemos detectado la presencia de otros tipos de proteínas cuya localización habitual no es la pared celular, pero que ya habían sido identificadas en la superficie por otros investigadores (Insenser y col., 2010; Braconi y col., 2011) como las proteínas Sod1, Ahp1 y Tsa1 incluidas en la categoría de respuesta a estrés, las proteínas metabólicas Eno1, Eno2, Fba1, Gpm1, Pgk1, Cdc19, Tdh1, Tdh3, Tpi1 Adh1 y Pdc1 y proteínas incluidas en la categoría de destino de proteínas como las chaperonas Hsp82, Ssa1, Ssa2 y Sse1.

Tabla 15. Proteínas de la superficie celular de *S. cerevisiae* obtenidas mediante digestión directa de la superficie celular con tripsina e identificadas mediante espectrometría de masas.

Grupos de proteínas	Proteínas
ORGANIZACIÓN DE LA PARED CELULAR	Act1, Bgl2, Ccw14, Pir4/Cis3, Crh1, Cwp1, Eng1/Dse4, Ecm33, Exg1, Gas1, Gas3, Gas5, Pir2/Hsp150, Yps2/Mkc7, Psa1, Pst1, Pir1, Scw10, Scw11, Scw4, Tos1, Crh2/Utr2, Ygp1, Yps3, Zeo1
RESPUESTA A ESTRÉS	Ahp1, Gpd1, Hsp12, Nsr1, Sod1, Tsa1, Ubi4, Yhb1
METABOLISMO	
Glucólisis	Cdc19, Eno1, Eno2, Fba1, Gpm1, Hxk1, Hxk2, Pfk1, Pfk2, Pgi1, Pkg1, Tdh1, Tdh2, Tdh3, Tpi1
Metabolismo de carbohidratos	Ado1, Bmh1, Gnd1, Suc2, Tal1, Tkl1
Fermentación alcohólica	Adh1, Adh2, Pdc1
Metabolismo de nucleótidos	Ade1, Ade17, Ade4, Ade5,7, Adk1, Pnc1, Vma1, Vma2, Gua1
Metabolismo de aminoácidos	Aro4, Cys3, Gln1, Grs1, Gus1, His4, Ilv5, Krs1, Met6, Sah1, Sam1, Sam2, Ses1, Shm2, Thr4, Ura2, Vas1
Síntesis de proteínas	Asc1, Cam1, Efb1, Eft1, Hyp2, Pab1, Rpl10, Rpl11a, Rpl12a, Rpl13b, Rpl15a, Rpl16a, Rpl16b, Rpl17a, Rpl17b, Rpl18a, Rpl19a, Rpl1a, Rpl20a, Rpl21a, Rpl24a, Rpl25, Rpl26b, Rpl27a, Rpl28, Rpl2a, Rpl3, Rpl33a, Rpl35a, Rpl36b, Rpl4a, Rpl5, Rpl6a, Rpl6b, Rpl7a, Rpl8a, Rpl8b, Rpl9a, Rpp0, Rpp2b, Rps0a, Rps10b, Rps11a, Rps12, Rps13, Rps14a, Rps15, Rps16a, Rps17a, Rps18a, Rps19a, Rps1a, Rps1b, Rps2, Rps20, Rps22a, Rps24a, Rps3, Rps4a, Rps5, Rps6a, Rps7a, Rps7b, Rps8a, Rps9b, Tef1, Tef4, Tif1, Tif3, Tif45, Yef3
Proteólisis	Ape3, Pep4, Prb1, Prc1
Metabolismo de lípidos	Fas1, Fas2, Fas3, Plb2, Plb3
Metabolismo de fosfatos	Ipp1, Pho3
DESTINO DE PROTEÍNAS	Cpr1, Cpr6, Hsc82, Hsp10, Hsp104, Hsp26, Hsp60, Hsp82, Kar2, Pdi1, Ssa1, Ssa2, Ssa4, Ssb1, Ssc1, Sse1, Ssz1, Sti1
OTRAS PROTEÍNAS	Acs2, Ald6, Cdc48, Ded1, Dld3, Emp47, Fet3, Gpp1, Nop1, Nop56, Nop58, Pda2, Pet9, Pma1, Spe3, Stm1, Sub2, Tma19, Tpm1

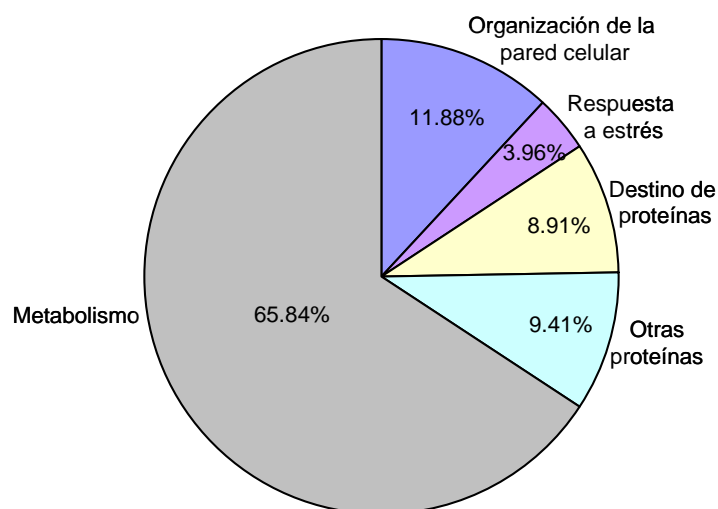


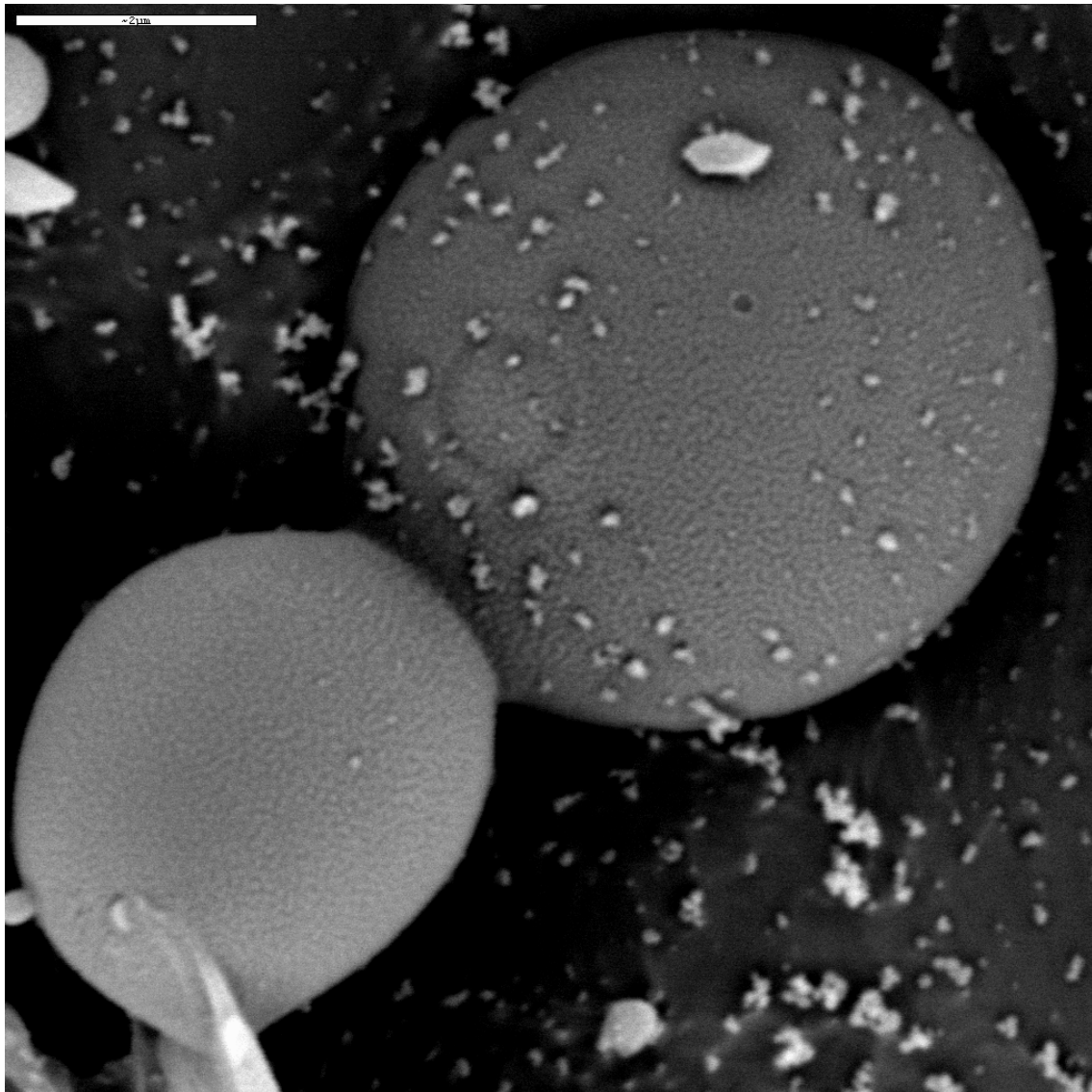
Figura 46. Clasificación de las proteínas identificadas de *S. cerevisiae* en el estudio del surfoma.

El hecho de realizar el análisis del surfoma en presencia de suero nos ha permitido conocer las proteínas humanas presentes en este fluido biológico capaces de interaccionar con la superficie celular de esta cepa virulenta de *S. cerevisiae*. De este análisis hemos identificado un total de 74 proteínas unidas a la superficie de las levaduras, entre éstas encontramos proteínas relacionadas con la respuesta inmune, la coagulación, el metabolismo de lipoproteínas y la respuesta a estrés (tablas 14 y 16). Entre las proteínas incluidas en la categoría de respuesta inmune, muchas de ellas pertenecen al sistema del complemento como C3, C5, C7, C9, factor B y subunidades de las proteínas C1, C4 y C8. También hemos identificado

Tabla 16. Proteínas humanas obtenidas mediante digestión directa con tripsina de la superficie celular de *S. cerevisiae* tras su incubación con suero humano e identificadas mediante espectrometría de masas.

Grupos de proteínas	Proteínas
RESPUESTA INMUNE	
Complemento	Subunidad B de C1q, subunidad C C1q, C1s, C3, C4b, cadena alfa de la proteína de unión a C4b, C5, C7, C8 (cadena beta), C9, Factor B
Inmunoglobulinas	Cadena C de la IgG2, cadena C de la IgG4, cadena C de la IgM, cadena C de la Ig kappa
COAGULACIÓN	Alfa-2-macroglobulina, protrombina, cadena alfa del fibrinogeno, cadena beta del fibrinogeno, fibronectina, glicoproteína rica en histidinas, kininogeno-1, plasminógeno, alfa-1-antitripsina, cofactor de heparina 2, alfa-2-antiplasmina
RESPUESTA A ESTRÉS	Hsp90-beta, Hsp de 70 kDa 1A/1B, Hsp de 70 kDa 1-like, proteína similar a la de Hsp de 71 kDa
METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS	Apolipoproteína A-I, apolipoproteína A-II, apolipoproteína A-IV, apolipoproteína B-100, apolipoproteína E, apolipoproteína L1, clusterina
QUERATINAS	Queratina tipo I de citoesqueleto 9, queratina tipo I de citoesqueleto 10, queratina tipo II de citoesqueleto 1, , queratina tipo II de citoesqueleto 2, queratina tipo II de citoesqueleto 6B
OTRAS PROTEÍNAS	Alpha-1B-glicoproteína, actina alfa de músculo cardíaco 1, actina citoplasmática 1, albumina sérica, angiotensinogeno, alfa-2-HS-glicoproteína, proteína AMBP, ceruloplasmina, factor de elongación 1-alfa 1, ficolina-3, proteína de unión a la vitamina D, subunidad beta de la hemoglobina, gelsolina, subunidad alfa de la hemoglobina, histona H4, haptoglobina, proteína relacionada con la haptoglobina, hemopexina, subunidad lábil a ácidos del complejo proteico de unión al factor de crecimiento tipo insulina, cadena pesada H1 del inhibidor inter-alfa-tripsina, cadena pesada H2 del inhibidor inter-alfa-tripsina, cadena pesada H4 del inhibidor inter-alfa-tripsina, N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, paraoxonasa/arilesterasa 1 serica, proteína ribosomal S13 de la subunidad 40S, alfa-1-antiquimotripsina, serotransferrina, trombospondina-1, factor derivado de epitelio pigmentado, proteína transportadora de aniones de la banda 3, transtiretina, vitronectina

proteínas de la cascada de coagulación como el plasminógeno, el fibrinógeno y la fibronectina, apolipoproteínas como las A-I, A-II, A-IV, B-100 y E, queratinas y proteínas de respuesta a estrés como la proteína de choque térmico Hsp90-beta. La información adicional de la identificación de estas proteínas se muestra en el anexo V, tabla 2.



DISCUSIÓN

1. Virulencia de cepas comerciales de *S. cerevisiae*.

La existencia de infecciones causadas por la levadura *S. cerevisiae* descritas en los últimos 20 años en la bibliografía clínica ha hecho que nos planteemos cuáles son los posibles orígenes de esta infección. Uno de ellos podría ser el consumo de suplementos dietéticos de levadura de cerveza (Jensen y Smith, 1976; Yáñez y col., 2009; Pérez-Torrado y col., 2012; Llopis, 2012). Estos suplementos se consumen en dosis elevadas y por largos periodos de tiempo y en estudios previos se ha observado que algunas de las cepas de levaduras de estos suplementos pueden mostrar virulencia en modelo murino (Yáñez y col., 2009; Llopis, 2012). Esto sugiere que podrían ser un potencial origen de infección, principalmente en personas inmunodeprimidas o con lesiones en la mucosa intestinal. Aunque no parece existir translocación de *S. cerevisiae* a la sangre cuando la barrera intestinal está intacta, según estudios realizados *in vitro* (Pérez-Torrado y col., 2012), cuando hay daño en ésta, las levaduras podrían translocarse y diseminarse como se ha visto en modelo murino de infección oral (Llopis, 2012). Aunque *S. cerevisiae* está considerado un organismo GRAS por la FDA, la existencia de casos clínicos provocados por esta levadura junto con la enorme variedad fenotípica de las cepas de esta especie, podría hacer necesaria una matización de este concepto. Por todo esto es de especial relevancia estudiar si las cepas usadas para los suplementos dietéticos y probióticos muestran virulencia en modelos experimentales y qué rasgos fenotípicos se podrían asociar con el carácter patógeno, para poderlos usar como indicadores al seleccionar dichas cepas para su uso comercial.

La virulencia de las cepas usadas en esta tesis ha sido estudiada anteriormente (Yáñez y col., 2009; de Llanos y col., 2011; Llopis, 2012). La cepa D5, correspondiente a un aislado de *S. cerevisiae* var *boulardii*, procedente de un probiótico comercial (Ultralevura®), la cepa clínica 102, aislada de un paciente en el que había producido infección respiratoria, y la cepa D14, procedente de suplementos dietéticos, son las que presentan mayor potencial patogénico en modelo murino de infección sistémica, al provocar las dos primeras la muerte en alrededor de un 20% de los ratones infectados y la última sobre un 30%. Las cepas D2 y D4, también aisladas de productos dietéticos, presentan menor potencial virulento al no causar mortalidad en dicho modelo, pero muestran un alto alojamiento en cerebro y riñón, indicativo de su capacidad para alcanzar y persistir en dichos órganos; mientras que la cepa D23, aislada de alimentos enriquecidos, la cepa vínica 10431 y la cepa de laboratorio W303 pueden considerarse avirulentas, por su incapacidad para colonizar y diseminarse en este modelo experimental. Estos estudios nos indican que existen cepas usadas en la industria con un cierto

potencial de virulencia mientras que otras parecen ser avirulentas.

Nuestros resultados del análisis de la presencia de rasgos asociados a la virulencia en estas cepas muestran la existencia de una relación entre algunos de estos caracteres y la virulencia que presentan en ratón, siendo las más virulentas (D14, D5, y 102) las que presentan un crecimiento más rápido a alta temperatura y una mayor resistencia al estrés oxidativo y osmótico. En el análisis inmunoproteómico también se observa una asociación entre la virulencia y la respuesta inmune mediada por anticuerpos, presentando la cepa más virulenta (D14) una inmunogenicidad muy superior a la de la cepa de laboratorio avirulenta (W303) tras infección experimental en ratón. En este estudio hemos encontrado además que la cepa D14 comparte un mayor número de antígenos que la W303 con la levadura patógena oportunista *C. albicans*.

La virulencia fúngica oportunista es un proceso complejo, ya que no existe un único factor de virulencia que lleve al patógeno oportunista a producir la infección sino que son necesarios un conjunto de éstos junto con el debilitamiento de las defensas del hospedador (van Burik y Magee, 2001). Existe una gran variabilidad de factores asociados a la patogenicidad de microorganismos y entre ellos hay que distinguir entre los que provocan daño o afectan directamente a las funciones de las células hospedadoras, como enzimas hidrolíticas o toxinas, y los que favorecen la colonización y la invasión, como las adhesinas e invasinas, de aquellos que permiten el crecimiento o la adaptación en el hospedador, como la resistencia a alta temperatura o a diferentes tipos de estrés. Estos últimos pueden ser vitales para sobrevivir en el hospedador, por lo que, aunque no son considerados como factores de virulencia *per se*, pueden tener una gran importancia en el desarrollo de infecciones oportunistas.

Como ya se ha comentado en la introducción, no se conocen con exactitud los factores implicados en la infección por *S. cerevisiae* y, aunque existen pocos estudios al respecto, se han conseguido relacionar algunos rasgos fenotípicos con la virulencia de esta levadura, como son el crecimiento a altas temperaturas, en concreto a 42°C (McCusker y col., 1994b), la pseudofilamentación (Clemons y col., 1994; McCusker y col., 1994b; de Llanos y col., 2006), la variación fenotípica o *switching* (Clemons y col., 1996), la secreción de fosfolipasas (McCusker y col. 1994a; de Llanos y col., 2006) y la tolerancia a estrés oxidativo (Diezmann y Dietrich, 2009).

El grupo de las Dras. Querol y Fernández-Espinar ha estudiado varios de estos rasgos asociados a la virulencia en las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de productos comerciales utilizadas en nuestro trabajo, en concreto la pseudofilamentación y la secreción de proteasas (tabla 17). En dicho estudio se observó correlación entre

estos rasgos fenotípicos y la virulencia *in vivo*, ya que sólo los aislados considerados como potencialmente patógenos en estos ensayos fenotípicos *in vitro* (D2, D4 y D14) fueron capaces de alojar y persistir un cierto tiempo en los órganos analizados y, además, produjeron en los ratones claros signos de enfermedad (Llopis, 2012). En este trabajo hemos estudiado el crecimiento a altas temperaturas, el fenómeno de *switching* y otras características que pensamos que también podían tener alguna relación con la virulencia como son la adhesión a plásticos, entre ellos a catéteres, el grado de activación de las rutas de transducción de señales, la resistencia a estrés oxidativo y osmótico y la morfología celular de diferentes cepas de *S. cerevisiae* aisladas de suplementos dietéticos, productos comerciales y probióticos.

Tabla 17. Virulencia en modelo murino y rasgos con posible asociación con la virulencia de cepas de *S. cerevisiae* aisladas de suplementos dietéticos y probióticos y sus correspondientes controles, tanto estudiados en este trabajo como en estudios anteriores del grupo de las Dras. Querol y Fernández-Espinar (de Llanos y col., 2006; de Llanos y col., 2011; Llopis, 2012).

Cepas	Virulencia	Crec. 39°C	Crec. 42°C	Resist. H ₂ O ₂	Crec. pseudohifal	Actividad enzimática	
						Proteasa	Fosfolipasa
D2	+	+++	+++	+	+	++	+
D4	+	++	±	-	++	+++	+
D5	++	+++	++	++	+	+++	+
D6	nd	-	-	-	-	nd	+
D14	++	+++	++	+++	++	+++	++
D23	-	-	-	-	-	nd	+
10431	-	-	-	-	-	-	-
W303	-	-	-	-	-	+	-
102	++	+++	+++	+++	++	+	+

n.d.: no descrito; en gris claro y gris oscuro se muestran las cepas control avirulentas y virulentas en modelo murino, respectivamente.

De todos los rasgos fenotípicos analizados tanto en éste como en anteriores estudios (de Llanos y col., 2006; Diezmann y Dietrich, 2009; de Llanos y col., 2011; Llopis, 2012), el crecimiento a altas temperaturas, la resistencia a estrés oxidativo y el desarrollo pseudohifal son los que presentan mayor asociación al carácter virulento en *S. cerevisiae* (tabla 17). El hecho de que las cepas que han resultado virulentas para el ratón, como D14, D5, 102 y en menor medida D2 y D4, sean las únicas capaces de crecer a 39°C o 42°C podría indicar su capacidad para mantenerse tanto a la temperatura corporal normal como en estados febriles, siendo un rasgo importante para el desarrollo de infección. Pero, además, estas cepas, a diferencia de las avirulentas, muestran un tiempo de generación a 37°C

menor que el de las cepas de laboratorio, lo que podría conferirles una ventaja en el proceso de colonización e infección. De hecho, entre las diferentes especies de *Candida* la más cercana filogenéticamente a *S. cerevisiae* es *C. glabrata*, y se piensa que una de las adaptaciones que diferencian a esta especie de *S. cerevisiae* como patógeno es su menor tiempo de generación a la temperatura del cuerpo humano (Roetzer y col., 2010). La mayor rapidez de crecimiento de nuestros aislados virulentos les asemeja, por tanto, a patógenos oportunistas como *C. glabrata*. La identificación de proteínas implicadas en la termotolerancia de *S. cerevisiae* (Hsp104 y Hsp82) (Borkovich y col., 1989; Cheng y col., 1992; Lindquist y Kim, 1996; Benjaphokee y col., 2012) en el surfoma de la cepa D14, podría relacionarse con su crecimiento óptimo a esta temperatura.

Las cepas que han mostrado menos rasgos asociados a la virulencia en nuestro estudio han sido las cepas D6 y D23, que fueron identificadas como cepas híbridas entre *S. kudriavzevii* y *S. cerevisiae* y entre *S. bayanus* y *S. cerevisiae*, respectivamente, por el grupo de las Dras. Querol y Fernández-Espinar (Llopis, 2012). Es interesante destacar que híbridos de estas especies han sido usados en la elaboración de vinos y cervezas y ha sido descrita su habilidad para crecer a bajas temperaturas mejor que las cepas de *S. cerevisiae* (Belloch y col., 2009). Por ello no es de extrañar la incapacidad de las cepas D6 y D23 para crecer a altas temperaturas, lo cual se puede relacionar además con su avirulencia en modelo murino (Llopis, 2012). Esto nos indica que estas cepas híbridas podrían ser más seguras para su uso industrial en suplementos dietéticos, ya que al no ser capaces de crecer a la temperatura del cuerpo humano no serían capaces de desarrollar una infección sistémica tras su consumo.

Respecto a la pseudofilamentación y el crecimiento invasivo, la detección en el estudio proteómico de expresión diferencial de mayor abundancia de proteínas relacionadas con estos procesos en la cepa virulenta D14 frente a la cepa avirulenta W303 se correlaciona con la capacidad de pseudofilamentar de dicha cepa [tabla 17; Llopis (2012)] y apoya la relación de este rasgo fenotípico con la virulencia de esta levadura. La pseudofilamentación parece permitir a las células vegetativas buscar nutrientes bajo condiciones ambientales adversas, aumentar la adhesión célula-célula y célula-sustrato y la capacidad de penetrar en el sustrato (Chen y Thorner, 2007), lo que les daría una ventaja en el proceso de infección. Una de las proteínas cuya abundancia se ve incrementada en la cepa D14 frente a la W303 es Asc1, subunidad beta de proteína G que forma parte de la subunidad 40S del ribosoma, que influye en la eficiencia de la traducción y en el tamaño de las células y que está relacionada con el crecimiento invasivo y la adhesión (Zeller y col., 2007). Otra proteína que ha sido relacionada con el crecimiento invasivo y la

virulencia en *C. albicans* es la septina Cdc10 (Warenda y col., 2003; González-Novo y col., 2006). La proteína homóloga en *S. cerevisiae* se encuentra aumentada en la cepa D14 frente a la W303 lo que podría estar relacionado con su mayor capacidad de pseudofilamentar.

En esta misma línea, hemos estudiado la ruta de señalización que regula el crecimiento pseudohifal e invasivo, mediada por la MAPK Kss1, y la ruta de integridad celular, mediada por la MAPK Slt2, ya que se ha descrito la activación constitutiva de estas MAPKs en cepas virulentas de *S. cerevisiae* (de Llanos y col., 2010). Aunque la cepa D14 presenta una alta capacidad de pseudofilamentar en condiciones de carencia de nitrógeno, no se apreció mayor fosforilación de Kss1 en medio completo, a diferencia de lo que ocurre con la otra cepa de mayor virulencia, D5 (*S. cerevisiae* var. *boulardii*), en la que si se observa la fosforilación constitutiva de esta MAPK, tal y como se describe en este trabajo y en el de de Llanos y col. (2010). Además, esta cepa presenta una morfología alargada que es congruente con la activación de Kss1 en condiciones basales, mientras que la cepa D14 tiene una morfología normal en dichas condiciones.

Por otra parte, el hecho de que ambas cepas, D14 y D5, tengan mayor fosforilación de Slt2 que la cepa de laboratorio avirulenta indica que podría existir una cierta relación entre virulencia y activación de la ruta de integridad celular. Esto podría deberse a que estas cepas presenten alguna alteración en la pared celular que provoque la activación continuada de Slt2 y con ello se genere una respuesta transcripcional para mantener la integridad de dicha estructura, que implique un cambio en sus componentes y en su ensamblaje (García y col., 2004). La activación constitutiva de la ruta también podría deberse a una mutación de ganancia de función en algún componente por encima de Slt2 o a la ausencia de una proteína reguladora negativa de esta ruta. Por ejemplo, una proteína que está disminuida en la cepa D14 respecto a la cepa W303 es Pil1, que es uno de los componentes principales de los eisosomas. Estos son complejos multiproteicos asociados a la membrana plasmática de levaduras, que organizan dominios de membrana y marcan sitios de endocitosis. Se ha descrito que los mutantes carentes de Pil1 muestran activación de la ruta de integridad celular (Zhang y col., 2004b). Por tanto, la menor cantidad de esta proteína en la cepa virulenta concuerda con el mayor nivel de fosforilación de Slt2 en esta cepa. Sea cual sea la causa, las diferencias en la composición de la pared celular que podrían derivar de la activación de esta ruta en estas cepas virulentas podrían constituir una ventaja para resistir al sistema inmunitario en caso de infección. De hecho, se ha sugerido que las alteraciones en la pared celular presentes en mutantes hipervirulentos de *S. cerevisiae* homocigóticos en el gen *SSD1* podrían dar lugar a diferencias respecto

al reconocimiento de células de *S. cerevisiae* por parte del sistema inmune innato del hospedador (Wheeler y col., 2003). Además, según estos autores, la elevada virulencia sobre ratones podría ser debida al choque séptico causado por una sobreestimulación de la respuesta pro-inflamatoria inducida por las características de superficie de esta cepa. En consonancia con todo ello, nuestros resultados del análisis inmunoproteómico revelan grandes diferencias en la respuesta inmunitaria generada por el hospedador entre las cepas virulenta y avirulenta estudiadas.

La detección de diferente abundancia de proteínas de respuesta a estrés osmótico y oxidativo entre la cepa virulenta y la avirulenta en el análisis proteómico cuantitativo, nos llevó a estudiar la sensibilidad o resistencia de las cepas a dichos estreses como otro posible rasgo de virulencia. De hecho, Diezmann y Dietrich, (2009) observaron una correlación entre el origen clínico de cepas de *S. cerevisiae* y la tolerancia a estrés oxidativo. En nuestro trabajo también hemos observado una relación entre la resistencia tanto a estrés oxidativo como osmótico y la virulencia de nuestras cepas de *S. cerevisiae* (tablas 5 y 17). Esta resistencia les daría a las levaduras una ventaja en el proceso de adaptación al cuerpo humano y sus defensas, por ejemplo frente al ambiente oxidativo y nitrosativo del macrófago. Como ya se ha comentado en la introducción, se conocen ciertos enzimas de *S. cerevisiae* que tienen acción destoxificante frente a las especies reactivas de oxígeno que provocan este estrés. Varias de ellas, como la superóxido dismutasa Sod1 y las peroxidasas Tsa1 y Ahp1, han sido identificadas en el surfoma de la cepa virulenta D14 en este trabajo. Todo esto reafirma la posible relación entre la resistencia a estrés oxidativo y la virulencia de esta cepa. Sin embargo, paradójicamente, en el estudio proteómico cuantitativo observamos que la gran mayoría de las proteínas anotadas como relacionadas con estrés oxidativo en las bases de datos (Yhb1, Pst2, Oye2, Oye3, Sod1, Sod2 y Ahp1), nitrosativo (Yhb1) y osmótico (Hsp26 y Rhr2) detectadas en nuestro análisis se encuentran en mayor abundancia en condiciones basales en la cepa avirulenta W303, que es menos resistente a estos tipos de estreses. Una posible explicación de este hecho podría ser que la cepa avirulenta W303 tuviese una expresión constitutiva alta de estas proteínas que no permita una inducción significativa ante el estrés y con ello una adecuada adaptación, siendo finalmente menos resistente en esas condiciones. Se esperaba que proteínas relacionadas con estrés oxidativo mostrasen un incremento de abundancia en la cepa virulenta ante la incubación con sangre, ya que Llopis y col. (2012) en un análisis transcriptómico utilizando la misma cepa D14 se observó un aumento de 17 genes implicados en estrés oxidativo a 60 minutos de incubación con sangre; si bien de las siete proteínas que hemos identificado relacionadas con estrés oxidativo, Llopis y col. (2012) sólo vieron aumentada la expresión de *AHP1*.

Hemos identificado cuatro proteínas relacionadas con el estrés oxidativo que aparecen en el estudio de Llopis y col. (2012), YNL134C, Ahp1 y Cys3 que a tiempo 0 están disminuidas en la cepa D14 con respecto a la W303 y Pgm2 que está aumentada, pero no se observa incremento de la abundancia de estas proteínas como consecuencia de la incubación con sangre. Las diferencias entre nuestro estudio y el de Llopis y col. (2012) pueden deberse a la diferencia en el tiempo de incubación, ya que en dicho estudio existe una gran variación en el patrón de genes sobreexpresados en función del tiempo, o a la dificultad de los estudios proteómicos de detectar proteínas poco abundantes, o bien al hecho de que los resultados obtenidos en proteómica y en genómica no siempre se correlacionan, ya que no todos los genes que se expresan se traducen, y la abundancia del RNAm y de las proteínas no sólo depende de su síntesis sino también de su estabilidad. En *C. albicans* se ha descrito el aumento de varias de las proteínas identificadas en nuestro estudio relacionadas con el estrés oxidativo (Ahp1, Sod1 y Sod2) como consecuencia de la fagocitosis por macrófagos (Cabezón, 2009). Esta diferencia con nuestros resultados puede deberse tanto a que no son las mismas condiciones experimentales como a que *C. albicans* es una especie mucho más virulenta que *S. cerevisiae* y por tanto su respuesta ante condiciones adversas es probablemente mucho mayor. De todas las proteínas relacionadas con el estrés oxidativo sólo Pst2, una proteína de función desconocida inducible en estas condiciones y secretable por protoplastos (Pardo y col., 2000a), ha mostrado un aumento de abundancia en la cepa virulenta y disminución en la avirulenta a lo largo de la incubación con sangre. También hay que destacar que la resistencia a estrés osmótico no se había relacionado aún a la virulencia de cepas de *S. cerevisiae*. Nuestro estudio indica que podría estarlo, aunque habría que ampliar el análisis a un número mayor de cepas para considerarlo como rasgo asociado a la patogenicidad de esta especie.

Otros procesos que hemos estudiado por su posible asociación con la virulencia fueron el fenómeno de *switching* colonial y la adhesión a diferentes plásticos. Clemons y col. (1996) analizaron el fenómeno de *switching* de *S. cerevisiae* en dos aislados virulentos y dos avirulentos, y relacionaron la aparición de varios fenotipos coloniales y la reversibilidad con los primeros, y la aparición de un único fenotipo colonial y mutantes *petites* con los segundos, asociando así el fenómeno de *switching* a la virulencia. Sin embargo, nuestras cepas no muestran esta asociación, lo que nos indica que esta relación no es general en *S. cerevisiae*, ya que solamente se ha descrito por este grupo de investigación y en un número bajo de cepas.

Ya se ha comentado que una de las posibles vías de infección de *S. cerevisiae* es la entrada nosocomial del microorganismo por los catéteres, desde donde

pueden pasar hacia la corriente sanguínea y órganos internos de los pacientes. Concretamente, Hennequin y col. (2000) describieron 4 casos clínicos en los que el origen de infección pudo ser la contaminación de catéteres por *S. cerevisiae* var. *boulardii*. Esto podría ser debido a que al abrir las cápsulas de Ultralevura® las levaduras podrían quedar en el aire y contaminar superficies inertes como los catéteres o las manos del personal sanitario que, por una incorrecta manipulación, podrían contaminar a su vez estos dispositivos. Por ello pensamos que la adhesión a plástico podría ser una característica importante para la infección de la levadura por esta vía, además de reflejar también su capacidad para unirse a superficies biológicas una vez dentro del organismo. Sin embargo, en nuestro estudio, no hemos podido asociar la adhesión a los plásticos utilizados con la virulencia, dado que las cepas más virulentas en el modelo de ratón, D5 (Ultralevura®) y D14, no mostraron una mayor capacidad de adhesión que el resto de las cepas aisladas de suplementos dietéticos. Estos resultados no quieren decir que la adhesión al plástico no tenga importancia para la infección por *S. cerevisiae*, pero apoyan que la vía de entrada más probable de estas cepas para la infección sea la gastrointestinal puesto que se administran por vía oral. Un dato importante a destacar es que en hospitales, la Ultralevura® se administra por esta vía en dosis elevadas y por periodos prolongados de tiempo a pacientes con problemas gastrointestinales que probablemente tengan dañada la mucosa, lo que como se indicó anteriormente puede favorecer la translocación de esta levadura.

La cepa que sí mostró mayor adhesión fue el aislado clínico 102, obtenida del fluido pleural de un paciente por el Servicio de Microbiología del Hospital Vall d'Hebrón (Barcelona) (de Llanos y col., 2004). De todos modos, la adhesión de esta cepa no fue comparable a la de *C. albicans*, para la que está ampliamente descrita la importancia de su adhesión a catéteres y la formación de biofilms en estos como foco de infección (Douglas, 2003; Nett y Andes, 2006; Mishra y col., 2007). Aunque en nuestro trabajo no se ha estudiado, se ha descrito que *S. cerevisiae* puede iniciar la formación de biofilms (Reynolds y Fink, 2001). Además, hay que decir que el grupo de la Dra. Fernández-Espinar ha estudiado la adhesión de varias cepas de *S. cerevisiae* a células epiteliales y endoteliales, obteniendo resultados heterogéneos (Yáñez y col., 2009). Entre las cepas estudiadas estaban la D14 y la D5 que mostraron una adhesión intermedia a células epiteliales (2%) y una adhesión alta a células endoteliales (6%) en comparación a la de los aislados clínicos ensayados y superior a la de la cepa vínica 10431, aunque su adhesión nunca fue comparable a la mostrada por *C. albicans* (60-30%). Cabe destacar que, en el análisis proteómico del surfoma, hemos identificado varias proteínas en la superficie celular de la cepa virulenta D14, como es el caso de

Pir4/Cis3 y Scw4, cuya eliminación, mediante delección de los genes correspondientes, se ha descrito que disminuye la adhesión de bacterias a la superficie de las células de *S. cerevisiae* (Tiago y col., 2012). También hemos encontrado en la superficie de la cepa D14 ortólogos de proteínas de *C. albicans* relacionadas con la adhesión a células o a proteínas humanas, como fibronectina o plasminógeno, como es el caso de Bgl2 (Jeng y col., 2005), Scw10 (Sandini y col., 2011), Utr2/Crh2 (Alberti-Segui y col., 2004), Yps3 (Albrecht y col., 2006), Hxk1 (Singh y col., 2001), Tdh3 (Gozalbo y col., 1998), Eno1 (Jong y col., 2003), Pgc1 (Crowe y col., 2003), Asc1 (Kim y col., 2010) o Tef1 (Crowe y col., 2003). Sin embargo, no hemos encontrado miembros de las familias de adhesinas típicas de especies patógenas, como las glicoproteínas de superficie ALS de *C. albicans* (Hoyer, 2001) o EPA de *C. glabrata* (Roetzer y col., 2010), lo que concuerda con el menor poder patógeno de *S. cerevisiae* en comparación con estas especies.

De acuerdo con estos resultados y con los publicados por otros grupos de investigación acerca de este tema, consideramos que es de especial relevancia la selección de cepas seguras de *S. cerevisiae* para su uso comercial. Se podría usar como criterio selectivo la ausencia de los rasgos fenotípicos que mejor se han podido asociar a la virulencia, es decir, que sean cepas que no crezcan a altas temperaturas, que no pseudofilamenten y que no sean resistentes a estrés oxidativo. Estas pruebas son muy sencillas de hacer y podrían eliminar el riesgo en los productos con *S. cerevisiae* que se comercializan como suplementos dietéticos. Una buena alternativa, como ya hemos comentado, es el uso de cepas híbridas como las estudiadas en este trabajo que parecen ser avirulentas y no presentar ninguna de estas características. En el caso del uso como probiótico, la falta de crecimiento a altas temperaturas como criterio para rechazar las cepas por riesgo de seguridad no sería posible, ya que podría afectar a sus características funcionales. Entre las acciones de los probióticos está la competencia con los patógenos intestinales por los nutrientes lumenales, por lo que estas cepas necesitan poder crecer óptimamente a la temperatura corporal para desempeñar su función. Pero si se podrían analizar las otras características señaladas y estudiar cómo afectaría su ausencia a la actividad probiótica.

2. Proteínas con posible relación con la virulencia de *S. cerevisiae*.

Existen pocos estudios centrados en cómo *S. cerevisiae* es capaz de sobrevivir en el torrente sanguíneo y llegar a invadir tejidos, debido principalmente al bajo número de casos clínicos descritos en comparación con otros patógenos. Llopis y col. (2012) realizaron un estudio transcriptómico de varias cepas de esta levadura

tras incubación con sangre. Entre las cepas que estudiaron estaban la D14 y la W303, incluidas también en nuestro trabajo, y observaron que a una hora de incubación se producía un aumento de la expresión de diferentes genes implicados en el metabolismo de aminoácidos, en la actividad fosfatasa y en la homeostasis redox celular.

El análisis proteómico realizado en este trabajo nos ha permitido conocer la respuesta de *S. cerevisiae* frente a la exposición a sangre humana en cuanto al contenido de proteínas, y, además, comparar lo que ocurre en una cepa virulenta (D14) y otra avirulenta (W303). Se eligió la incubación con sangre como condición experimental para mimetizar el ambiente en que se encuentran las levaduras en su diseminación por el torrente sanguíneo, siendo esperable que en estas condiciones se transcriban los genes y se sinteticen las proteínas que permitan sobrevivir a la cepa virulenta. Fradin y col. (2003) en un estudio genómico de interacción entre *C. albicans* y sangre vieron que el perfil de expresión génica variaba mucho en función del medio elegido como precultivo de la interacción, comparando entre medio Lee y YPD; además, observaron que los genes que variaban independientemente del medio de precultivo se expresaban generalmente a tiempos más largos (30 y 60 min). Por esta razón elegimos para nuestro estudio el medio de precultivo RPMI que se asemeja en composición y características a la sangre y que se usa para el cultivo de células humanas.

Con ello pretendíamos no detectar las variaciones debidas al cambio de composición nutricional y de pH que se producen en función del medio elegido y centrarnos en los cambios debidos a las características de la sangre y a los mecanismos de defensa existentes en ella que consiguen eliminar un alto porcentaje de levaduras. El principal componente sanguíneo que actúa sobre *C. albicans* es la población de neutrófilos (Fradin y col., 2005), por lo que es probable que también lo sean en el caso de *S. cerevisiae*. Además, elegimos tiempos largos, 1.5 y 3 horas para asegurarnos de detectar estos cambios, y ya que a 1.5 h habíamos detectado mayor supervivencia de la cepa virulenta en sangre, pensamos que en esas condiciones encontraríamos proteínas que habían permitido a esta cepa sobrevivir más que la cepa avirulenta. De acuerdo con esta hipótesis se detectaron más cambios a 1.5 que a 3 h. Sin embargo, es importante destacar que se produjeron pocos cambios en la abundancia de proteínas al comparar la cepa virulenta a lo largo del tiempo de incubación con sangre. Esto puede ser debido a que esta cepa virulenta tenga presentes constitutivamente las proteínas que contribuyen a su virulencia, aunque también podría ser debido a que solamente veamos una parte del proteoma de la levadura. Estos resultados se han obtenido a partir de extractos citoplasmáticos totales separados mediante

electroforesis bidimensional y pudiera ser que los mayores cambios de expresión proteica se diesen en otras localizaciones de la célula, como en la superficie celular, o que algunas de las proteínas implicadas en la virulencia estén en cantidades no detectables por esta técnica. Además, como puede verse en el análisis estadístico de componentes principales de nuestro estudio, las muestras pertenecientes al tiempo cero no se separan de forma clara de las de los tiempos de interacción con sangre y quizás hagan falta un número mayor de réplicas biológicas para obtener mayor cantidad de proteínas que varíen su abundancia de forma estadísticamente significativa.

En el estudio transcriptómico de Llopis y col. (2012) se usó como medio de precultivo el medio YPD y tiempos más cortos de interacción con sangre; estas diferencias en las condiciones experimentales entre este trabajo y el nuestro podrían explicar parte de las discrepancias en los resultados obtenidos, además de a las diferencias ya comentadas que suelen darse entre estudios genómicos y proteómicos.

Uno de los grupos genéticos funcionales activados en diferentes microorganismos ante la interacción con sangre o células sanguíneas es el de los genes implicados en respuesta a estrés oxidativo (Fradin y col., 2003), lo cual es lógico por el entorno de especies reactivas del oxígeno que se produce durante la fagocitosis por las células sanguíneas. De hecho, estos genes, como ya se ha comentado antes, se ven sobreexpresados en cepas virulentas de *S. cerevisiae* ante la incubación con sangre (Llopis y col., 2012), en concreto a una hora de incubación, momento en el cual la mayoría de las levaduras están fagocitadas (84%). En nuestro caso sólo hemos detectado la proteína Pst2 cuya cantidad está aumentada en la cepa virulenta y se mantiene en la avirulenta a hora y media de interacción. Hay que destacar que esta proteína está regulada por el factor de transcripción Yap1, implicado en la tolerancia al estrés oxidativo (Lee y col., 1999), cuya eliminación se ha descrito que disminuye la supervivencia de los mutantes de la cepa virulenta D14 en sangre (Llopis y col., 2012). Por ello consideramos a Pst2 como una interesante candidata para el estudio de su implicación en virulencia.

Estudios a gran escala de la interacción de distintos microorganismos con sangre o células sanguíneas han relacionado el ciclo del glioxilato con la respuesta a esta interacción (Lorenz y Fink, 2001; Lorenz y Fink, 2002). Fradin y col. (2003) estudiaron la respuesta transcripcional de *C. albicans* en presencia de sangre, describiendo la inducción de genes característicos de este ciclo. Otros microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis* también inducen el ciclo del glioxilato ante la fagocitosis (McKinney y col., 2000), mientras que en *C. neoformans* se induce este ciclo en el sitio de infección sin necesidad de

exponerse a la fagocitosis (Rude y col., 2002). Lorenz y Fink (2001) estudiaron los genes implicados en la respuesta a la fagocitosis de *S. cerevisiae* y de *C. albicans* por parte de macrófagos de mamíferos y también observaron que estaban inducidos los genes del ciclo del glioxilato; en concreto los más inducidos fueron *ICL1* (isocitrato liasa) y *MLS1* (malato sintasa) que son genes que codifican proteínas específicas de la ruta y que no se comparten con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Sin embargo, mientras que se ha relacionado de forma directa el gen *ICL1* con la virulencia de *C. albicans* (Lorenz y Fink, 2001) y de *M. tuberculosis* (McKinney y col., 2000), la delección de este gen en *S. cerevisiae* no disminuyó su supervivencia *in vivo* (Goldstein y McCusker, 2001) al igual que ocurrió en *C. neoformans* (Rude y col., 2002). Este resultado, junto al hecho de que estos dos genes *ICL1* y *MLS1* aparezcan reprimidos en el estudio transcriptómico de diferentes cepas de *S. cerevisiae* (entre ellas la D14) en respuesta a la incubación con sangre (Llopis y col., 2012), y que no hayamos observado variación de abundancia de las correspondientes proteínas en el análisis proteómico llevado a cabo en este trabajo sobre la cepa D14, sugiere que estas proteínas contribuyen poco a la adaptación de *S. cerevisiae* *in vivo*. Dado que el ciclo del glioxilato permite el uso de compuestos de dos carbonos, como el acetato y el etanol, para que la célula los use cuando no hay otra fuente de carbono, es probable que en la sangre las células de levadura tengan acceso a suficiente glucosa. Sin embargo, en nuestro estudio hemos encontrado un aumento en la cantidad de la proteína Cit1 (citrato sintasa) en la cepa virulenta D14 a lo largo del tiempo mientras que en la avirulenta W303 no varía. *CIT1* codifica una de las proteínas compartidas entre el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y el ciclo del glioxilato. Aunque no se ha descrito su inducción transcripcional en *S. cerevisiae* en condiciones de fagocitosis (Lorenz y Fink 2001) ni en respuesta a la interacción con sangre (Llopis y col., 2012), si se ha visto una inducción de este gen en estudios de genómica y proteómica en la interacción de *C. albicans* por macrófagos (Fernández-Arenas y col., 2007; Cabezón, 2009). Se ha descrito que los mutantes *cit1Δ* de *S. cerevisiae* son sensibles a temperatura y a compuestos que generan especies reactivas del oxígeno como el H₂O₂ y presentan envejecimiento prematuro debido a la apoptosis (Lee y col., 2007). Por todo ello, el aumento de la proteína Cit1 podría tener importancia para la mayor supervivencia de la cepa D14 en sangre observada en nuestro trabajo.

Se han encontrado un alto número de proteínas con distinta abundancia entre las dos cepas antes de la incubación con sangre (tiempo 0), lo que evidencia las grandes diferencias que hay entre ellas. Varias de estas proteínas participan en las rutas de glucolisis, gluconeogénesis, síntesis del glicerol y fermentación de la

glucosa, como puede verse en la figura 47. El análisis de estas rutas sugiere que en la cepa D14 la síntesis del glicerol podría estar disminuida respecto a la W303 [proteína implicada: Rhr2 (DL-glicerol fosfato fosfatasa)]. También se han detectado proteínas implicadas en el metabolismo de aminoácidos, síntesis proteica, transporte celular y proteínas de función desconocida. En concreto, la cepa D14 tiene aumentadas las proteínas implicadas en la biosíntesis de leucina, isoleucina y valina [proteínas implicadas: Ilv2 (acetolactato sintasa) e Ilv5 (ácido quetol reductoisomerasa)], la degradación de la arginina [proteína implicada: Car1 (arginasa)] y la biosíntesis del folato [proteína implicada: Shm2 (serina hidroximetiltransferasa)], mientras que la cepa W303 tiene aumentadas las enzimas que participan en la biosíntesis de cisteína [proteínas implicadas: Cys3 (cistationina gamma-lyasa 3) y Cys4 (cistationina beta-sintasea 4)] y la biosíntesis de prolina (proteína implicada: Pro2). Respecto a la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, tiene tres isoformas, Tdh1, Tdh2 y Tdh3, que se comportan de

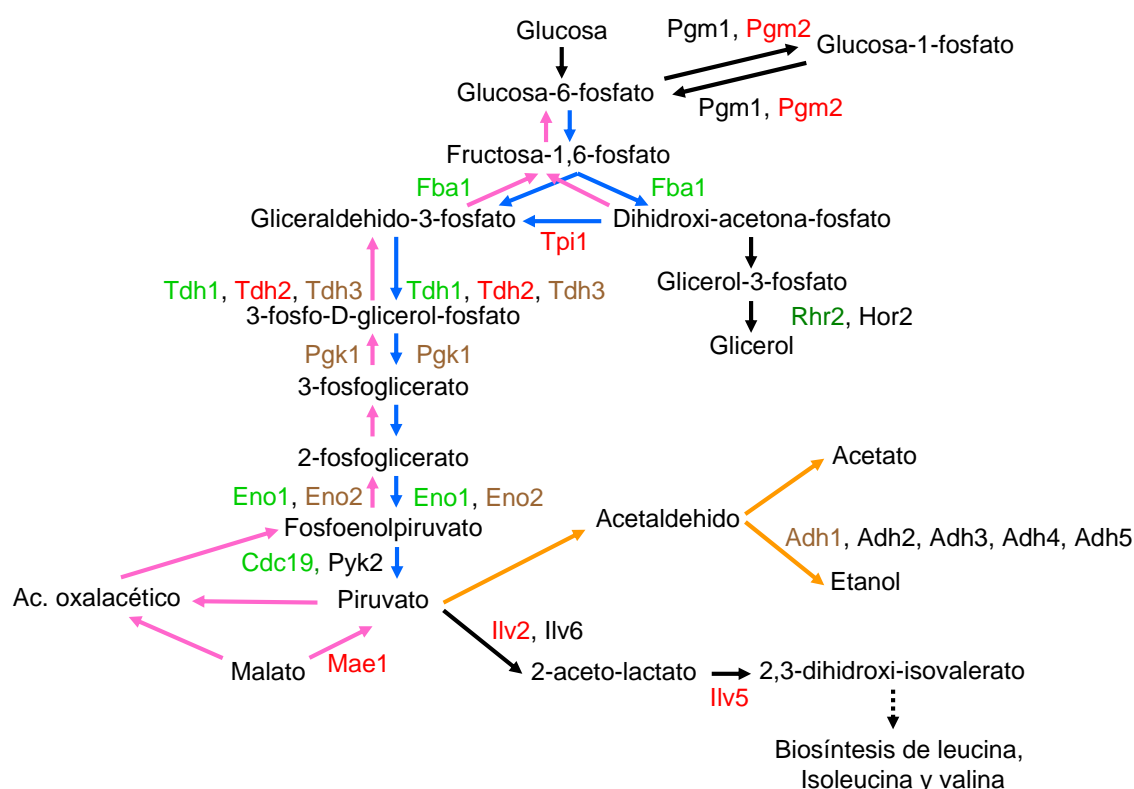


Figura 47. Esquema de las rutas de glucólisis, gluconeogénesis, fermentación de la glucosa y síntesis de glicerol, donde se indican las proteínas con aumento y disminución de cantidad en la cepa D14 respecto a la W303 a tiempo 0 de interacción con sangre.

En rojo y verde se indican las proteínas identificadas con un aumento o disminución de cantidad en la cepa D14, respectivamente. En marrón las proteínas en las que hemos identificado formas proteicas tanto que aumentan como que disminuyen de cantidad. Las flechas azules y rosas indican la glucólisis y gluconeogénesis, respectivamente. La fermentación de la glucosa se indica con flechas naranjas.

manera diferente en nuestro estudio, esto puede ser debido a las diferencias en su regulación (Boucherié y col., 1995). Las proteínas Tdh3 y Adh1 presentan especies proteicas que están unas aumentadas y otras disminuidas con ratios muy elevados. Por el momento no sabemos a que es debido, por lo que el estudio de la actividad de estas especies proteicas sería muy interesante para el futuro.

Lógicamente, no todas las diferencias encontradas entre cepas son achacables a la potencial virulencia de la cepa D14, pero algunas de ellas podrían ayudar a una mejor adaptación a un medio hostil, ya que como se ha comprobado W303 se adapta peor a la mayoría de estreses sometidos a ambas cepas y crece de manera más lenta en condiciones favorables (medio rico YPD, 30°C). Además, nos indican un camino a seguir para confirmar la posible implicación en el proceso de infección de algunas de las proteínas identificadas, como las ya comentadas en el apartado anterior, implicadas en la pseudofilamentación y en la respuesta a diferentes estreses, cuya diferencia de abundancia entre cepas se mantiene a lo largo de la interacción con sangre.

Destacamos que algunas de las proteínas diferenciales entre cepas también son reguladas por Yap1, como Sod1, Sod2, Ahp1, Cys3, Oye3, YLN134C y Pgm2 (Lee y col., 1999). En total 9 de las 32 proteínas descritas por Lee y col. (1999) como reguladas por Yap1 aparecen en nuestro trabajo, lo que subraya la importancia de este factor de transcripción en la supervivencia en sangre antes comentada (Llopis y col., 2012). Por tanto, la detección de la actividad de este factor de transcripción podría ser útil como una característica más a tener en cuenta para la selección de cepas comerciales.

3. Potenciales marcadores de infección por *S. cerevisiae*.

Los estudios de inmunoproteómica se usan principalmente para identificar patrones de anticuerpos protectores y proteínas candidatas para el desarrollo de vacunas, así como para descubrir potenciales biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades infecciosas. En *S. cerevisiae*, debido principalmente a su reciente inclusión entre los patógenos oportunistas emergentes, sólo hay un estudio de este tipo realizado con varias cepas virulentas de origen clínico y una cepa avirulenta (de Llanos, 2007). De las 37 proteínas identificadas como inmunogénicas en nuestro análisis (tabla 18), utilizando extractos citoplasmáticos de la cepa D14 y la W303 de *S. cerevisiae* enfrentados a sueros de ratones infectados con dichas cepas, 9 fueron coincidentes con las encontradas en dicho trabajo previo. Las diferencias entre estos estudios pueden deberse al tipo de ratón

Tabla 18. Comparación de las proteínas inmunogénicas detectadas en este trabajo mediante *Western blotting* y las previamente descritas como inmunogénicas en *S. cerevisiae* por De Llanos (2007) (en verde).

Grupos de proteínas	Proteínas
METABOLISMO	
Glucólisis y gluconeogénesis	<i>Cdc19</i> , <i>Eno1</i> , <i>Eno2</i> , <i>Pgk1</i> , <i>Tdh1</i> , <i>Tdh2</i> , <i>Tdh3</i>
Ruta de los ácidos tricarboxílicos	<i>Idh1</i>
Fermentación alcohólica	<i>Adh1</i> , <i>Pdc1</i>
Metabolismo de aminoácidos	<i>Gln1</i> , <i>Ilv5</i> , <i>Shm1</i> , <i>Shm2</i>
Síntesis de proteínas	<i>Rpl5</i> , <i>Rpp0</i> , <i>Tef1</i>
Proteólisis	<i>Pep4</i> , <i>Prb1</i>
RESPUESTA A ESTRÉS	
Respuesta a estrés oxidativo	<i>Ahp1</i> , <i>Oye2</i> , <i>Yhb1</i>
Chaperonas	<i>Hsp60</i> , <i>Ssb1</i> , <i>Ssc1</i> , <i>Sse1</i> , <i>Ssz1</i>
OTRAS PROTEÍNAS	
	<i>Atp1</i> , <i>Bfr1</i> , <i>Dbp2</i> , <i>Egd2</i> , <i>Gcd11</i> , <i>Imd2</i> , <i>Kes1</i> , <i>Lat1</i> , <i>Sbp1</i> , <i>Stm1</i>

En cursiva se muestran las proteínas que también han sido identificadas en el surfoma de la cepa D14 de *S. cerevisiae* en nuestro trabajo.

utilizado y al uso de distintas condiciones experimentales y diferentes cepas de *S. cerevisiae*. De hecho, en nuestro estudio hemos encontrado que la respuesta de anticuerpos es muy variable en función de la cepa de *S. cerevisiae* ensayada.

Entre las proteínas inmunogénicas que hemos detectado encontramos dos grupos principales, el de las proteínas metabólicas y en especial las glicolíticas y el de las proteínas relacionadas con la respuesta a estrés, donde encontramos proteínas relacionadas con estrés oxidativo y chaperonas asociadas con la respuesta a estrés térmico (Tabla 18).

Para que las proteínas de cualquier microorganismo sean inmunogénicas y se generen anticuerpos frente a ellas, deben encontrarse en alta concentración y disponibles en el hospedador. Esto puede ocurrir por diferentes circunstancias: que sean proteínas con una alta abundancia relativa con respecto al resto de proteínas de la célula; que se liberen en gran cantidad en el cuerpo humano, como resultado de la lisis celular provocada por el hospedador durante la infección; que se trate de proteínas naturalmente secretadas al medio extracelular; o que estén siempre expuestas, debido a su localización en la superficie celular. En las levaduras, esta localización es característica de proteínas estructurales de la pared celular y de proteínas enzimáticas implicadas en la biosíntesis o remodelación de componentes de esta estructura, como quitina y glucano (Orlean, 2012). Existen también otras proteínas, cuya función metabólica y localización intracelular se conoce desde hace mucho tiempo, pero que se encuentran también presentes en la pared celular, siendo cada vez más sólidas las evidencias de su versatilidad funcional (Nombela y col., 2006). La capacidad antigénica de muchas de estas proteínas multifuncionales, como las enzimas glicolíticas *Eno1* o *Tdh3*, ha sido descubierta en *C. albicans*

mediante estudios inmunoproteómicos (Pitarch y col., 2001; Pitarch y col., 2006). Dado que nuestro estudio inmunoproteómico se ha realizado utilizando extractos citoplasmáticos, es lógico que no se detecte inmunorreactividad con proteínas cuya única localización sea la pared celular, pero que sí se observe sobre estas otras proteínas multifuncionales presentes en ambas localizaciones. Una prueba más de su localización externa es que muchas de ellas han sido identificadas también en el surfoma, tanto en nuestro estudio (tabla 18) como en estudios previos (Insenser y col., 2010; Braconi y col., 2011).

Como ya se ha comentado, el análisis inmunoproteómico nos ha permitido además comparar la respuesta inmunitaria provocada en el ratón por la cepa virulenta D14 y por la cepa avirulenta W303. El hecho de que se detecte una mayor respuesta sérica en los ratones infectados con la cepa D14 puede ser debido a que esta cepa tiene una mayor capacidad infectiva y muestra un mayor alojamiento en cerebro y riñón, por lo que permanece más tiempo en el ratón (Llopis, 2012). Además, la cepa D14 muestra mayor supervivencia en presencia de sangre, lo que sugiere una mayor resistencia a las defensas del hospedador, y se ha descrito que esta cepa presenta un menor porcentaje de fagocitosis por macrófagos de ratón que cepas avirulentas de *S. cerevisiae* (Yáñez y col., 2009). La mayor generación de anticuerpos frente a cepas virulentas respecto a cepas avirulentas de esta levadura ha sido también descrita por de Llanos (2007). Además, no sólo la cantidad sino el patrón de proteínas inmunogénicas es bastante diferente entre ambas cepas, si bien algunas de ellas son comunes (figura 48).

Es interesante resaltar que existen mayores coincidencias en el patrón de proteínas inmunogénicas entre la cepa D14 de *S. cerevisiae* y la cepa de *C. albicans* utilizada en este trabajo, ambas virulentas en el modelo murino, que entre las dos cepas, virulenta y avirulenta, de *S. cerevisiae* (figura 48). Esta coincidencia en la inmunorreactividad sugiere que las cepas virulentas, incluso de diferentes especies, estarían exponiendo ante el hospedador patrones de proteínas similares. De hecho, hemos encontrado muchas similitudes entre el surfoma de la cepa D14 y el de *C. albicans*, lo cual es explicable también por el alto porcentaje de proteínas homólogas entre ambas especies.

La identificación de proteínas inmunogénicas específicas de la cepa virulenta de *S. cerevisiae*, así como otras comunes con *C. albicans*, abre la posibilidad de proponer marcadores de diagnóstico tanto específicos para la infección por *S. cerevisiae* o por *C. albicans* como generales para infecciones por levaduras.

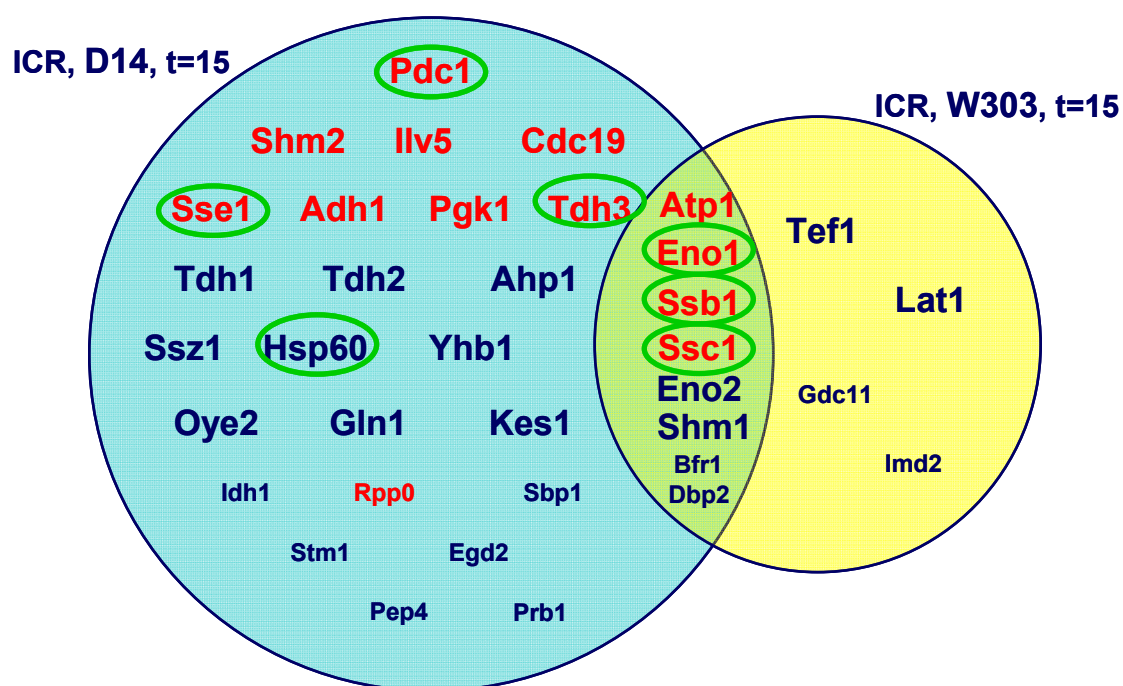


Figura 48. Diagrama de Venn en el que se muestran las proteínas inmunogénicas frente a sueros de ratones ICR/Swiss a tiempo 15 días post-infección de las cepas D14 (fondo azul) y W303 (fondo amarillo) de *S. cerevisiae*.

Tamaño de letra grande: intensidad de señal elevada en la inmunodetección. Tamaño de letra pequeño: intensidad de señal baja en la inmunodetección. Letra de color rojo: proteína descrita en la bibliografía como inmunogénica en *C. albicans* tanto con sueros de ratón como con humanos (Pitarch y col., 1999; Pitarch y col., 2001; Pitarch y col., 2004; Fernández-Arenas y col., 2004; Pitarch y col., 2006; Pitarch y col., 2008; Martínez-López y col., 2008; Pitarch y col., 2011). Las proteínas rodeadas en verde son aquellas en las que se ha detectado inmunorreactividad cruzada en este trabajo con los sueros de *S. cerevisiae* frente a proteínas de *C. albicans*.

Un dato de interés a la hora de seleccionar los posibles marcadores de diagnóstico es la variación del perfil de proteínas inmunogénicas a lo largo de la infección. En nuestro estudio, a los 15 días post-infección se aprecia mayor cantidad de proteínas inmunogénicas y de mayor intensidad que a los 30 días en ambas cepas. En general, las proteínas de choque térmico aparecen más al inicio de la infección, mientras que las clasificadas como metabólicas mantienen su inmunorreactividad a lo largo de toda la infección, aunque en muchos casos disminuye la intensidad de la señal.

Entre las proteínas inmunogénicas detectadas en nuestro análisis se encuentra un amplio grupo de proteínas relacionadas con el estrés, como las chaperonas, que son proteínas cuya función es favorecer el plegamiento de las proteínas, la resolubilización de agregados proteicos, la translocación de proteínas a la mitocondria y al retículo endoplasmático y la regulación de la expresión de otras proteínas de choque térmico (Becker y Craig, 1994; Hartl, 1996; Bukau y Horwich, 1998). Las chaperonas se han descrito como inmunogénicas en una amplia gama de microorganismos (Maresca y Kobayashi, 1994; Moseley, 2000), entre ellos *C. albicans* (Martínez y col., 1998), y están a menudo asociadas con una respuesta

protectora frente a infecciones por dichos patógenos (Pockley, 2003), como es el caso de Hsp90 en las candidiasis (Matthews y Burnie, 1996). Varias de las chaperonas identificadas en nuestro estudio, como Ssb1, Ssc1, Hsp60 y Sse1, son también inmunorreactivas en *C. albicans* (Pitarch y col., 2001; Pitarch y col.; 2004; Martínez-López y col., 2008; Pitarch y col., 2011) (figura 48), lo que las convierte en potenciales candidatos para el diagnóstico de infecciones por levaduras. Respecto a las proteínas de respuesta a estrés oxidativo, tanto Ahp1, como Oye2 (NADPH deshidrogenasa) e Yhb1 (Flavohemoglobina involucrada en la desintoxicación de óxido nítrico), podrían ser buenos candidatos como posibles marcadores específicos de infección por *S. cerevisiae* ya que muestran una alta reactividad y no han sido identificadas como inmunorreactivas en la cepa avirulenta W303 ni en *C. albicans* (figura 48). Otra proteína relacionada con el estrés que cumple con estas características y, por lo tanto, podría ser un buen marcador de infección por *S. cerevisiae* es la chaperona Ssz1.

Respecto a las diecinueve proteínas inmunogénicas clasificadas como metabólicas identificadas en este estudio (tabla 18), ocho ya habían sido descritas por de Llanos (2007), y varias de ellas también se habían observado como inmunorreactivas en estudios similares de la levadura *C. albicans* (Pardo y col., 2000b; Pitarch y col., 2001; Pitarch y col., 2004; Fernández-Arenas y col., 2004; Pitarch y col., 2006; Pitarch y col., 2008; Martínez-López y col., 2008; Pitarch y col., 2011). Además, diecisiete de estas diecinueve proteínas han sido encontradas en el surfoma de la cepa D14, lo que, como se ha comentado anteriormente, indica una localización superficial además de intracelular (tabla 18). Muchas proteínas de este tipo se han estudiado como potenciales marcadores para el diagnóstico de infecciones por distintos microorganismos debido a su alta inmunogenicidad, como es el caso concreto de las enzimas glicolíticas Eno1, Fba1, Pgc1 y Tdh3 de *C. albicans* (Pitarch y col., 2006). En nuestro estudio, la mayoría de ellas, a excepción de Eno1 y Eno2, se han detectado sólo en la cepa virulenta D14 (figura 48). El que las proteínas Eno1, Tdh3 y Pdc1 sean inmunogénicas tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans* indica que estas proteínas no serían adecuadas para el diagnóstico específico de infecciones por *S. cerevisiae*, aunque sí para un diagnóstico más general de infecciones por levaduras, ya que, además, muestran inmunorreactividad cruzada. El hecho de que las proteínas Tdh1 y Tdh2 no existan en *C. albicans*, pero que presenten una alta similitud con la denominada Tdh3 en esta especie, hace que estas proteínas no sean tampoco indicadas para el diagnóstico específico de infecciones por *S. cerevisiae*. Algunas proteínas metabólicas que podrían estudiarse como potenciales marcadores específicos de *S. cerevisiae* (figura 48) son: Gln1 (Glutamina sintetasa), que es la más interesante

ya que muestra un alto nivel de reacción frente al suero de ratones infectados con la cepa virulenta D14 de *S. cerevisiae*, y, aunque su inmunorreactividad es más baja, Idh1 (isocitrato deshidrogenada 1), Pep4 (carboxipeptidasa Y-deficiente) y Prb1 (proteínasa B1). Dentro de la categoría de las proteínas metabólicas se incluyen también proteínas implicadas en la síntesis proteica, como factores de elongación de la traducción y proteínas ribosomales (tabla 18), de las que existen también evidencias de su localización en la superficie celular de diferentes microorganismos (Marques y col., 1998; Lim y col., 2001; Pitarch y col., 2002; Urban y col., 2003) y de su inmunogenicidad, habiendo sido propuestas, por ello, para la elaboración de posibles vacunas (Oliveira y Splitter, 1996; Ribeiro y col., 2002; Coler y col., 2002; Iborra y col., 2003). Sin embargo, las proteínas de este grupo encontradas en nuestro análisis, Rpl5 (proteína ribosomal L5), Tef1 (factor de elongación 1) y Rpp0 (proteína ribosomal P0) no parecen ser de utilidad como marcador de infección específica por *S. cerevisiae*.

Del resto de proteínas inmunogénicas no englobadas en las clasificaciones anteriores destaca Kes1 (proteína de unión al oxisterol) por su alta reactividad y especificidad para *S. cerevisiae*.

Una vez identificadas las posibles proteínas candidatas para servir como biomarcadores para el diagnóstico de infecciones de *S. cerevisiae*, el siguiente paso sería ver si se detectan también con sueros de ratones infectados con otras cepas virulentas de *S. cerevisiae*, y validar las más interesantes, enfrentándolas en forma purificada a sueros humanos de pacientes tanto con infección frente a *S. cerevisiae* como con otras infecciones fúngicas como candidiasis.

4. Proteínas de la superficie celular de *S. cerevisiae*: el surfoma.

El análisis proteómico del surfoma de la cepa virulenta D14 en presencia de suero, además de confirmar la localización superficial de algunas de las proteínas antigénicas detectadas mediante inmunoproteómica, nos ha permitido incrementar el conocimiento sobre las proteínas más externas de la pared celular de *S. cerevisiae*. Existen dos trabajos previos de análisis del surfoma mediante digestión directa de la superficie celular de *S. cerevisiae* con tripsina, ambos utilizando cepas avirulentas de laboratorio o vínicas y sin incubación con suero, uno en el que se describen 52 proteínas (Insenser y col., 2010), 31 de las cuales han aparecido en nuestro trabajo, y otro en el que se identifican un total de 44 proteínas (Braconi y col., 2011), de las que también hemos observado 38 (figura 49). De hecho, solamente se han identificado 17 proteínas comunes entre los tres trabajos, lo que podría deberse a las diferencias en las condiciones experimentales

y a las cepas ensayadas. También hay que destacar que en nuestro análisis se han identificado 150 proteínas adicionales respecto a los trabajos anteriores, probablemente debido a la mayor sensibilidad del espectrómetro de masas utilizado (LTQ Orbitrap) además de a las diferencias experimentales.

Respecto a la localización celular de las proteínas identificadas, el hecho de encontrar en nuestro análisis un elevado número de proteínas típicas de la pared celular, como las proteínas GPI y PIR (Figura 50), pone de manifiesto la utilidad de

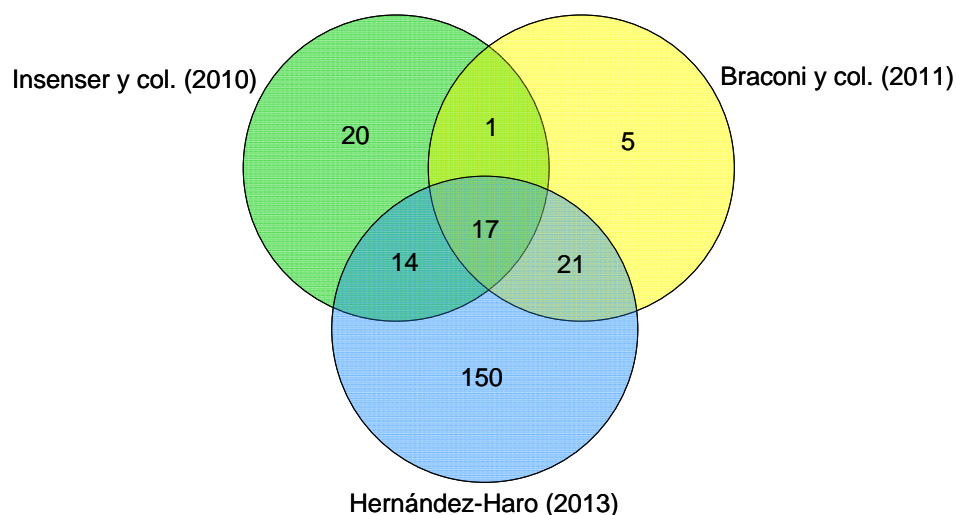


Figura 49. Análisis mediante diagrama de Venn de las proteínas de *S. cerevisiae* identificadas en el estudio del surfoma en relación con estudios anteriores.

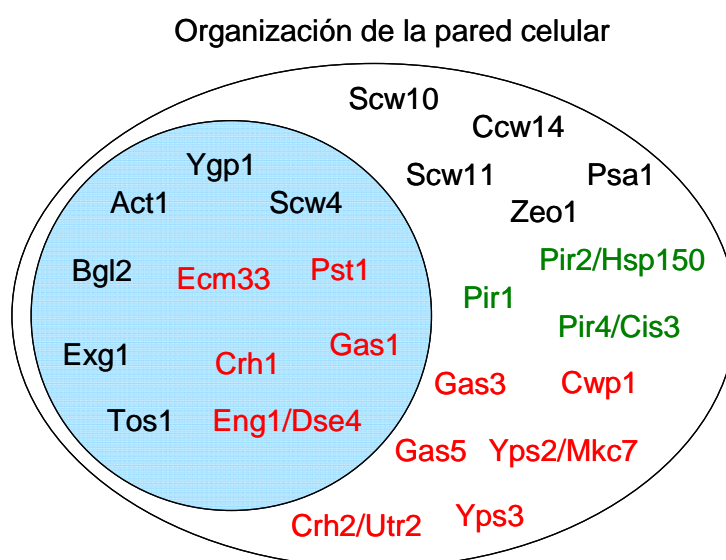


Figura 50. Proteínas de *S. cerevisiae* identificadas en el estudio del surfoma clasificadas en la categoría de organización de la pared celular.

Dentro del círculo azul se encuentran las proteínas identificadas en los estudios anteriores del surfoma de *S. cerevisiae*. En rojo se muestran las proteínas GPI y en verde las PIR

esta estrategia para el estudio de la composición de esta estructura celular y apoya que ésta sea la localización del resto de proteínas encontradas. De hecho, 11 de las proteínas clasificadas dentro de la categoría de organización de la pared celular ya habían sido identificadas en estudios previos del surfoma por tripsinización de célula entera de otras cepas de *S. cerevisiae* (Insenser y col., 2010; Braconi y col., 2011), añadiendo nuestro estudio 14 proteínas adicionales a este grupo, utilizando esta misma metodología (Figura 50). Doce de ellas se habían encontrado previamente mediante otras técnicas proteómicas o diferentes metodologías bioquímicas, genéticas y microscópicas, mientras que Psa1 y Zeo1 es la primera vez que se detectan en la superficie celular de esta levadura (tabla 19). Psa1 es una GDP-manosa pirofosforilasa que sintetiza GDP-manosa, esencial en la glicosilación de proteínas y necesaria para la biosíntesis y adecuada estructura de la pared celular (Hashimoto y col., 1997; Yoda y col., 2000), que hasta ahora sólo había sido detectada en el citoplasma en diferentes análisis globales de localización (Kumar y col., 2002; Huh y col., 2003). Zeo1, cuya localización ha sido descrita en la membrana plasmática, es una proteína relacionada con la organización de la pared celular ya que interacciona con el sensor Mid2 y modula la ruta de integridad celular mediada por Pck1 y Slt2 (Green y col., 2003; Delom y col., 2006).

Además de Zeo1, varias de las proteínas encontradas en nuestro estudio se habían identificado previamente mediante un estudio proteómico en la membrana plasmática, como es el caso de las proteínas metabólicas Pgi1 (glucosa-6-fosfato isomerasa), Tpi1 (triosafosfato isomerasa), Met6 (homocisteína metiltransferasa), Shm2 (serina hidroximetiltransferasa) y Ade17 (proteína Ade17 de la biosíntesis de la purina), y las proteínas de choque térmico Hsc82 (chaperona de la familia HSP90), Hsp12 (proteína de choque térmico de 12 kDa) y Ssb1 (proteína de choque térmico Ssb1) (Delom y col., 2006). Estas proteínas no tienen dominios transmembranales, por lo que deben estar asociadas a la membrana plasmática mediante diferentes anclajes a otras proteínas o a los lípidos de la membrana. El hecho de encontrar péptidos de estas proteínas en el surfoma podría ser debido a que sean accesibles al tratamiento con tripsina, al estar situadas hacia la cara externa de la membrana plasmática, o bien, que puedan tener también una localización natural en la pared celular.

Algunas de las proteínas que hemos identificado en el surfoma habían sido previamente localizadas en el medio extracelular por otros autores, como es el caso de las proteínas metabólicas Suc2 (Carlson y col., 1983), Ygp1 (Curwin y col., 2009), Plb3 (Merkel y col., 1999) o Pho3 (Nosaka y col., 1989). En este caso, dado que estas proteínas deben atravesar la pared celular para llegar a su destino, es lógico que se puedan detectar utilizando esta estrategia proteómica.

Tabla 19. Comparación de las proteínas de la superficie celular de *S. cerevisiae* obtenidas mediante digestión directa de la superficie celular con tripsina e identificadas mediante espectrometría de masas en relación con la bibliografía previa. En azul se muestran las proteínas identificadas anteriormente en la superficie celular de *S. cerevisiae*. En rosa se muestran las proteínas identificadas solamente en la superficie celular de *C. albicans*.

Grupos de proteínas	Proteínas
ORGANIZACIÓN DE LA PARED CELULAR	Act1, Bgl2, Ccw14, Cis3, Crh1, Cwp1, Eng1/Dse4, Ecm33, Exg1, Gas1, Gas3, Gas5, Hsp150, Mkc7, Psa1, Pst1, Pir1, Scw10, Scw11, Scw4, Tos1, Utr2, Ygp1, Yps3, Zeo1
RESPUESTA A ESTRÉS	Ahp1, Gpd1, Hsp12, Nsr1, Sod1, Tsa1, Ubi4, Yhb1
METABOLISMO	
Glicólisis	Cdc19, Eno1, Eno2, Fba1, Gpm1, Hxk1, Hxk2, Pfk1, Pfk2, Pgi1, Pkg1, Tdh1, Tdh2, Tdh3, Tpi1
Metabolismo de carbohidratos	Ado1, Bmh1, Gnd1, Suc2, Tal1, Tkl1
Fermentación alcohólica	Adh1, Adh2, Pdc1
Metabolismo de nucleótidos	Ade1, Ade17, Ade4, Ade5,7, Adk1, Pnc1, Vma1, Vma2, Gua1
Metabolismo de aminoácidos	Aro4, Cys3, Gln1, Grs1, Gus1, His4, Ilv5, Krs1, Met6, Sah1, Sam1, Sam2, Ses1, Shm2, Thr4, Ura2, Vas1
Síntesis de proteínas	Asc1, Cam1, Efb1, Eft1, Hyp2, Pab1, Rpl10, Rpl11a, Rpl12a, Rpl13b, Rpl15a, Rpl16a, Rpl16b, Rpl17a, Rpl17b, Rpl18a, Rpl19a, Rpl1a, Rpl20a, Rpl21a, Rpl24a, Rpl25, Rpl26b, Rpl27a, Rpl28, Rpl2a, Rpl3, Rpl33a, Rpl35a, Rpl36b, Rpl4a, Rpl5, Rpl6a, Rpl6b, Rpl7a, Rpl8a, Rpl8b, Rpl9a, Rpp0, Rpp2b, Rps0a, Rps10b, Rps11a, Rps12, Rps13, Rps14a, Rps15, Rps16a, Rps17a, Rps18a, Rps19a, Rps1a, Rps1b, Rps2, Rps20, Rps22a, Rps24a, Rps3, Rps4a, Rps5, Rps6a, Rps7a, Rps7b, Rps8a, Rps9b, Tef1, Tef4, Tif1, Tif3, Tif45, Yef3
Proteolisis	Ape3, Pep4, Prb1, Prc1
Metabolismo de lípidos	Fas1, Fas2, Fas3, Plb2, Plb3
Metabolismo de fosfatos	Ipp1, Pho3
DESTINO DE PROTEÍNAS	Cpr1, Cpr6, Hsc82, Hsp10, Hsp104, Hsp26, Hsp60, Hsp82, Kar2, Pdi1, Ssa1, Ssa2, Ssa4, Ssb1, Ssc1, Sse1, Ssz1, Sti1
OTRAS PROTEÍNAS	Acs2, Ald6, Cdc48, Ded1, Dld3, Emp47, Fet3, Gpp1, Nop1, Nop56, Nop58, Pda2, Pet9, Pma1, Spe3, Stm1, Sub2, Tma19, Tpm1

Respecto al análisis de las funciones de las proteínas identificadas en nuestro estudio, un alto número de ellas las hemos catalogado como proteínas metabólicas (tabla 19), y entre ellas se encuentran muchas cuya presencia en la pared celular de *S. cerevisiae* ha sido descrita en numerosos trabajos tanto mediante la estrategia aquí utilizada (Insenser y col., 2010; Braconi y col., 2011) como por otras técnicas proteómicas u otras metodologías diferentes (López-Ribot y Chaffin, 1996; Hamada y col., 1999; Delgado y col., 2001; Yin y col., 2005). La mayoría de estas proteínas no poseen péptido señal para ser dirigidas a la pared celular mediante la vía de secreción clásica, por lo que su presencia en la superficie celular ha sido controvertida durante muchos años. Sin embargo, como ya se ha

comentado, en la actualidad esto está ampliamente comprobado y aceptado tanto en *S. cerevisiae* como en otros microorganismos (Pardo y col., 1999; Pitarch y col., 2002; Crowe y col., 2003; Urban y col., 2003; Nombela y col., 2006; Hernáez y col., 2010; Insenser y col., 2010; Braconi y col., 2011).

También encontramos en el surfoma proteínas clasificadas en la categoría de destino de proteínas, donde están las chaperonas, como las de la familia de las HSP70 Ssa1, Ssa2, Ssa4, Ssb1, Ssc1, Sse1 y Ssz1. Si bien su localización clásica está en el citoplasma o en la mitocondria, en el caso de Ssc1, diferentes autores han identificado varias de ellas en la superficie celular de *S. cerevisiae* y *C. albicans* (López-Ribot y Chaffin, 1996; Pardo y col., 2000a; Urban y col., 2003; Braconi y col., 2011). Su presencia en el surfoma podría indicarnos que tienen funciones de plegamiento en la superficie celular.

En resumen, de todas las proteínas que hemos identificado en el surfoma de la cepa D14 de *S. cerevisiae*, la localización en la superficie celular era conocida para 71 de ellas (tabla 19), mientras que 131 de estas proteínas no habían sido descritas anteriormente en esta localización. Al comparar estas últimas proteínas con las obtenidas por Parra (2013) en un estudio del surfoma de *C. albicans* en presencia de suero, en el que se usó también LTQ Orbitrap como espectrómetro de masas, hemos encontrado 72 proteínas de esta especie, cuyos ortólogos aparecen también en el surfoma de *S. cerevisiae* (tabla 19), lo que apoya que estas proteínas se localicen realmente en la superficie celular de levaduras. Tras estos análisis podemos decir que en este trabajo se han identificado 59 proteínas cuya localización no había sido descrita aún en la superficie celular ni de *S. cerevisiae* ni de *C. albicans*. Estos resultados indican, además, que la sensibilidad del LTQ Orbitrap permite identificar un gran número de proteínas, probablemente minoritarias en la superficie celular, no detectadas anteriormente por otras técnicas. Entre ellas, es destacable la presencia de un grupo de proteínas relacionadas con proteólisis: Ape3 (Aminopeptidasa Y), Pep4 (Proteinasa A vacuolar), Prb1 (Proteinasa B vacuolar) y Prc1 (Carboxipeptidasa Y). El hecho de que estas proteínas que interaccionan entre sí, aunque típicamente vacuolares, se hayan encontrado en la superficie celular, sugiere que también podrían tener una función proteasa en esta localización y jugar algún papel en la virulencia de *S. cerevisiae*. De hecho, la secreción extracelular de enzimas hidrolíticas se considera una propiedad muy importante en la patogénesis de levaduras como *C. albicans* y *C. neoformans* al facilitar la invasión, destruyendo o alterando los componentes de las células del hospedador (Ghannoum, 2000). La cepa D14 tiene una alta actividad proteasa (Llopis, 2012) en comparación con otras cepas, por lo que sería interesante comprobar si la presencia de estas proteasas en la superficie

celular de la cepa virulenta D14 se correlaciona con dicha actividad, ya que estas proteínas no se han encontrado antes en la superficie celular de *S. cerevisiae*.

Otras proteínas de interés encontradas en el surfoma de *S. cerevisiae* son las fosfolipasas B Plb2 y Plb3. Las fosfolipasas son también enzimas hidrolíticas que pueden degradar las barreras estructurales de las células del hospedador. En *C. albicans*, se ha relacionado la secreción de fosfolipasa B con la invasión de tejidos y la virulencia, ya que estas enzimas son las responsables de hidrolizar las uniones éster de los glicerolfosfolípidos que se encuentran en la membrana celular (Karkowska-Kuleta y col., 2009). En *S. cerevisiae* se ha asociado una mayor secreción de estas enzimas con el origen clínico de las cepas y la virulencia en modelo murino (de Llanos y col., 2006; de Llanos y col., 2011). El hecho de haber encontrado estas enzimas en el surfoma de la cepa virulenta D14 es coherente con la mayor actividad fosfolipasa mostrada por esta cepa entre todas las cepas de origen dietético analizadas en este estudio (Llopis, 2012), y apoya la hipótesis de que estas proteínas podrían estar también relacionadas con la virulencia en *S. cerevisiae*. A su vez, la ausencia de dicha actividad en las cepas avirulentas W303 y 10431 justificaría que, hasta ahora, no se hayan detectado en análisis proteómicos de la pared celular anteriores.

5. Adhesión de proteínas de sangre y suero humanos a la superficie de *S. cerevisiae*.

Se ha descrito la unión de diferentes proteínas de sangre y suero a la superficie celular de levaduras, como es el caso de proteínas del sistema del complemento, cadenas de inmunoglobulinas, proteínas de la cascada de coagulación, como el plasminógeno, el fibrinógeno y la fribronectina, y otras proteínas como la gelsolina y la vitronectina (Klotz y col., 1994; Gozalbo y col., 1998; Klotz y col., 2001; Crowe y col., 2003; Jong y col., 2003; Bucki y col., 2005; Rauceo y col., 2006; Luo y col., 2013). Las proteínas humanas que hemos identificado unidas a la cepa D14 de *S. cerevisiae* en nuestro trabajo son muy similares a las encontradas en un estudio del surfoma de *C. albicans* en presencia de suero, realizado por nuestro grupo de investigación (Parra, 2013), lo que nos indica, que en estas condiciones, el comportamiento de esta cepa de *S. cerevisiae* es muy similar al de *C. albicans*.

Dentro de las proteínas séricas identificadas unidas a la superficie de *S. cerevisiae* está el plasminógeno. Se conocen las proteínas de *C. albicans* que se unen a esta proteína humana y están implicadas en su activación, como son Eno1, Gpm1, Tsa1, Cta1, Tdh3, Tef1, Pgk1, Adh1 y Fba1 (Crowe y col., 2003; Jong y col., 2003), y todas ellas, excepto Cta1, han sido detectadas en el surfoma de

S. cerevisiae. El plasminógeno una vez convertido en plasmina en la superficie de las levaduras puede contribuir, por su actividad serín proteasa, al bloqueo de la activación del complemento y a la degradación de la matriz extracelular para invadir tejidos y producir necrosis. Se ha descrito que las proteínas Gpm1 (fosfoglicerato mutasa 1) y Gpd2 (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 2) de *C. albicans* además de unirse al plasminógeno lo hacen también a proteínas inhibitoras del sistema del complemento, como el factor H y el FHL-1, por lo que se han asociado a la evasión del sistema inmune (Luo y col., 2013). El hecho de que los ortólogos de ambas proteínas se localicen en la superficie de *S. cerevisiae* sugiere que, en esta levadura, sean también estas proteínas las implicadas en dicha interacción. Aunque en nuestro trabajo sólo hemos detectado la presencia de plasminógeno, en un ensayo de interacción a gran escala se ha identificado a Gpm1 de *S. cerevisiae* como una proteína de unión a los factores H y FHL-1 (Poltermann y col., 2007), lo que confirma dicha hipótesis. Otra de las proteínas relacionadas con la regulación del complemento que encontramos asociada a la superficie de la cepa D14 de *S. cerevisiae* es la proteína de unión a C4b (C4BP). Esta proteína, que también se ha descrito asociada a la superficie de *C. albicans* (Meri y col., 2004), favorece la degradación de este componente de la ruta, inhibiendo así la activación del complemento.

Otras proteínas séricas que hemos identificado asociadas a la superficie de esta levadura son la fibronectina y la vitronectina, que se unen a Adh1 y Tdh3 y a Adh1 respectivamente en *C. albicans* (Gozalbo y col., 1998; Klotz y col., 2001), cuyos ortólogos en *S. cerevisiae* también aparecen en el surfoma.

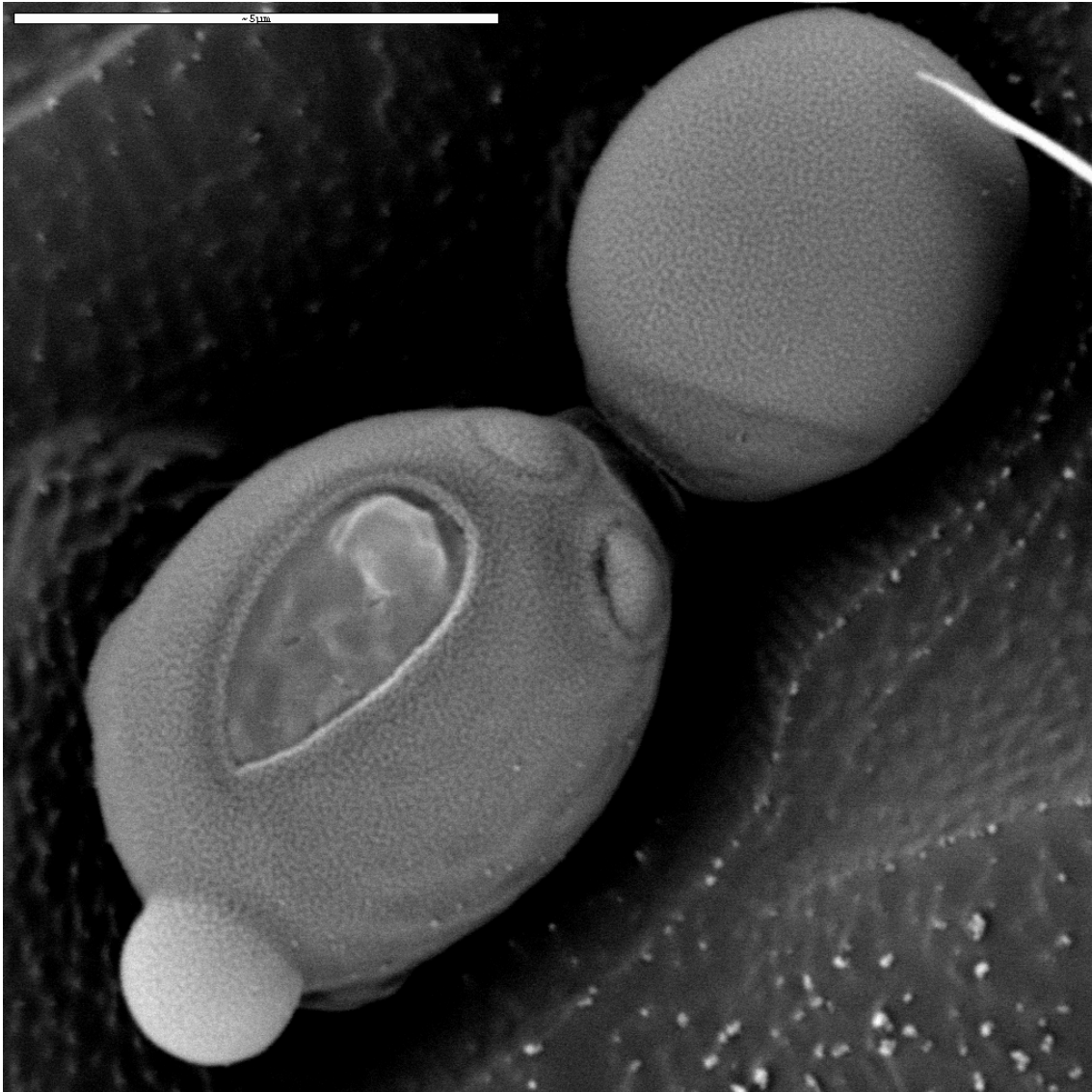
Respecto a las proteínas del sistema del complemento, hemos identificado un gran número de ellas unidas a la superficie de *S. cerevisiae*, C1, C3, C4, C5, C7, C8, C9, la properdina y el factor B. Se sabe que la proteína C3b se une covalentemente a las superficies celulares mediante enlace tioéster a hidratos de carbono y complejos inmunes de forma específica (Sahu y Lambris, 2001), actuando como opsonina favoreciendo la fagocitosis. C3b se produce por acción de los complejos enzimáticos de C3-convertasas que catalizan la rotura de C3 para generar C3b y C3a. La unión de C3b a *C. albicans* se ha relacionado con la cantidad de glucanos expuestos en la pared celular (Boxx y col., 2010). Por ello, como se ha comentado anteriormente, las variaciones en esta estructura que presentan las diferentes cepas de *S. cerevisiae* podrían modificar su reconocimiento por el complemento. Aunque no disponemos de datos comparativos del surfoma de cepas virulenta y avirulentas, el hecho de que hayamos detectado mayor cantidad tanto de C3b como del factor B en la cepa W303 respecto a la D14 tras su incubación con sangre en el análisis proteómico diferencial, sugiere que pueda existir mayor unión

de estas proteínas a la cepa W303, y con ello, mayor eficacia de la acción del sistema del complemento sobre esta cepa.

Además de la opsonización, otras funciones del complemento son la generación de una reacción inflamatoria para reclutar mecanismos inmunitarios celulares y humorales y la eliminación de microorganismos mediante la formación de poros en su superficie para inducir su lisis. Sin embargo, no se ha observado la producción del poro en la membrana celular de los hongos, lo que se explicaría por la protección estérica de la capa de polisacáridos de la pared celular que impide el anclaje del complejo enzimático a la membrana celular (Kozel y col., 1996; Zipfel y Skerka, 2009). Hay que destacar que proteínas que forman el complejo de ataque a la membrana, como C5, C7, C8 y C9, han sido identificadas unidas a la superficie celular de *S. cerevisiae* por lo que parece que el poro podría formarse en la superficie; sin embargo, no hemos observado lisis tras incubar las células con suero activo, lo que nos lleva a pensar que el poro no es funcional.

A parte de estas proteínas, se ha identificado un grupo de apolipoproteínas unidas a la superficie celular de *S. cerevisiae*. Se ha descrito una relación entre la Apolipoproteína E y la capacidad innata de protección frente a las candidiasis, ya que se ha observado una mayor susceptibilidad a la candidiasis invasiva en ratones deficientes en dicha proteína (Vonk y col., 2004). Además, también se ha encontrado una actividad antifúngica en péptidos derivados de la Apolipoproteína E (Rossignol y col., 2011). Por ello, podría ser que la unión de estas apolipoproteínas a *S. cerevisiae* tuviese alguna función defensiva frente a la levadura.

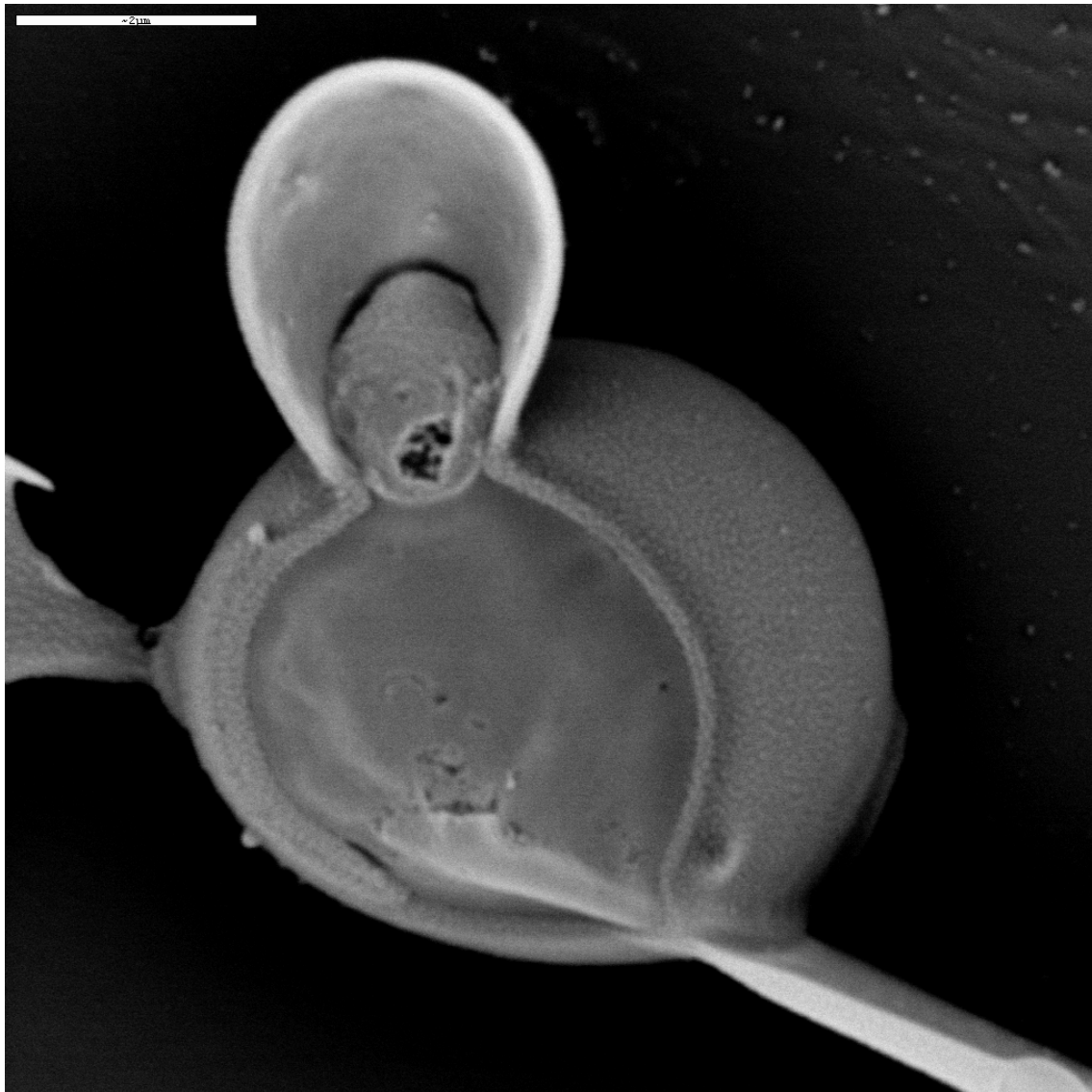
En resumen, el estudio de cepas virulentas y avirulentas de *S. cerevisiae* realizado en este trabajo, tanto utilizando análisis fenotípicos clásicos como técnicas proteómicas, ha permitido obtener una visión global e integrada de las diferencias entre estas cepas y su relación con el hospedador, generando nueva información sobre una cuestión controvertida y poco estudiada.



CONCLUSIONES

1. El crecimiento a altas temperatura (39 y 42°C) y la resistencia al estrés oxidativo son los rasgos fenotípicos analizados en cepas de *S. cerevisiae* aisladas de suplementos dietéticos, alimentos enriquecidos y probióticos (D2, D4, D5, D6, D14 y D23) que mostraron mayor relación con la virulencia de dichas cepas en modelo murino.
2. No se ha encontrado relación entre el fenómeno de *switching* colonial y la virulencia de las cepas estudiadas. Tampoco se ha encontrado una relación directa entre la capacidad de adhesión a plástico y la virulencia, ya que las distintas cepas mostraron distintos grados de adhesión en función de la naturaleza del plástico. El aislado clínico 102 fue el único que mostró una elevada adhesión a todos los tipos de plásticos analizados.
3. Las cepas D5, D6 y D14 presentaron una activación constitutiva de la MAPK de la ruta de integridad celular Slt2, lo que refleja posibles alteraciones en la composición de su pared celular. La cepa D5, aislada de la preparación Ultralevura®, fue la única que presentó activación basal de la MAPK de la ruta de crecimiento pseudohifal/invasivo Kss1, lo que se correlaciona con su morfología alargada.
4. La comparación mediante 2D-DIGE de los proteomas de la cepa virulenta D14 de *S. cerevisiae* y la cepa de laboratorio avirulenta W303 durante su interacción con sangre ha permitido detectar cambios en la abundancia de proteínas implicadas en el choque térmico, la pseudofilamentación, el crecimiento invasivo y la resistencia a estrés oxidativo y osmótico.
5. La cepa virulenta D14 presentó una mayor supervivencia que la cepa W303 tras su incubación durante 1.5 horas en sangre.
6. La cepa D14 provoca mayor respuesta serológica que la W303 en un sistema murino de infección y comparte mayor número de proteínas inmunogénicas con *C. albicans*.
7. Se han identificado 37 proteínas reconocidas por los sueros de ratones infectados con *S. cerevisiae*, 26 de las cuales no habían sido descritas como proteínas inmunogénicas en esta levadura. 25 de las proteínas inmunogénicas también han sido localizadas en la superficie de la cepa D14 mediante el análisis del surfoma.

8. El análisis del surfoma de *S. cerevisiae* D14 en presencia de suero humano mediante digestión de proteínas con tripsina sobre célula viva ha permitido identificar 202 proteínas de *S. cerevisiae*, 150 de las cuales no se habían detectado en los trabajos previos de surfoma de esta levadura. Además, se han encontrado 74 proteínas de suero humano unidas a la superficie celular de *S. cerevisiae*, la mayoría de ellas implicadas en la respuesta inmune.



BIBLIOGRAFÍA

- Aebersold R, Mann M. 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422: 198-207.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801.
- Al-Shahrour F, Mínguez P, Vaquerizas JM, Conde L, Dopazo J. 2005. BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments. *Nucleic Acids Res* 33: W460-464.
- Alberti-Seguí C, Morales AJ, Xing H, Kessler MM, Willins DA, Weinstock KG, Cottarel G, Fechtel K, Rogers B. 2004. Identification of potential cell-surface proteins in *Candida albicans* and investigation of the role of a putative cell-surface glycosidase in adhesion and virulence. *Yeast* 21: 285-302.
- Albrecht A, Felk A, Pichova I, Naglik JR, Schaller M, de Groot P, Maccallum D, Odds FC, Schafer W, Klis F, Monod M, Hube B. 2006. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J Biol Chem* 281: 688-694.
- Arendrup MC, Sulim S, Holm A, Nielsen L, Nielsen SD, Knudsen JD, Drenck NE, Christensen JJ, Johansen HK. 2011. Diagnostic issues, clinical characteristics, and outcomes for patients with fungemia. *J Clin Microbiol* 49: 3300-3308.
- Aucott JN, Fayen J, Grossnicklas H, Morrissey A, Lederman MM, Salata RA. 1990. Invasive infection with *Saccharomyces cerevisiae*: report of three cases and review. *Rev Infect Dis* 12: 406-411.
- Azie N, Neofytos D, Pfaller M, Meier-Kriesche HU, Quan SP, Horn D. 2012. The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance(R) registry and invasive fungal infections: update 2012. *Diagn Microbiol Infect Dis* 73: 293-300.
- Badenhorst L, Botha PL, van Rensburg MN. 1991. The incidence of hospital fungal infections-yeast fungaemia. *S Afr Med J* 79: 302-3.
- Barnett J, Payne RW, Yarrow D. 1983. *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge University Press.
- Becker J, Craig EA. 1994. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem* 219: 11-23.
- Behnsen J, Lessing F, Schindler S, Wartenberg D, Jacobsen ID, Thoen M, Zipfel PF, Brakhage AA. 2010. Secreted *Aspergillus fumigatus* protease Alp1 degrades human complement proteins C3, C4, and C5. *Infect Immun* 78: 3585-3594.
- Bellocchio S, Bozza S, Montagnoli C, Perruccio K, Gaziano R, Pitzurra L, Romani L. 2005. Immunity to *Aspergillus fumigatus*: the basis for immunotherapy and vaccination. *Med Mycol* 43 Suppl 1: S181-188.
- Belloch C, Pérez-Torrado R, González SS, Pérez-Ortín JE, García-Martínez J, Querol A, Barrio E. 2009. Chimeric genomes of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *Appl Environ Microbiol* 75: 2534-2544.
- Benjaphokee S, Koedrith P, Auesukaree C, Asvarak T, Sugiyama M, Kaneko Y, Boonchird C, Harashima S. 2012. CDC19 encoding pyruvate kinase is important for high-temperature tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *N Biotechnol* 29: 166-176.
- Bjellqvist B, Pasquali C, Ravier F, Sánchez JC, Hochstrasser D. 1993. A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis* 14: 1357-1365.
- Blanco JL, García ME. 2008. Immune response to fungal infections. *Vet Immunol Immunopathol* 125: 47-70.
- Blanco MT, Sacristan B, Lucio L, Blanco J, Pérez-Giraldo C, Gómez-García AC. 2010. Cell surface hydrophobicity as an indicator of other virulence factors in *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 27: 195-199.
- Blankenship JR, Heitman J. 2005. Calcineurin is required for *Candida albicans* to survive calcium stress in serum. *Infect Immun* 73: 5767-5774.

- Borkovich KA, Farrelly FW, Finkelstein DB, Taulien J, Lindquist S. 1989. hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol Cell Biol* 9: 3919-30.
- Bouakline A, Lacroix C, Roux N, Gangneux JP, Derouin F. 2000. Fungal contamination of food in hematology units. *J Clin Microbiol* 38: 4272-4273.
- Bouchérié H, Bataille N, Fitch IT, Perrot M, Tuite MF. 1995. Differential synthesis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides in stressed yeast cells. *FEMS Microbiol Lett* 125:127-33.
- Bouza E, Muñoz P. 2004. *Saccharomyces cerevisiae*: the end of the innocence. *Rev Esp Quimioter* 17: 227-231.
- Boxx GM, Kozel TR, Nishiya CT, Zhang MX. 2010. Influence of mannan and glucan on complement activation and C3 binding by *Candida albicans*. *Infect Immun* 78: 1250-1259.
- Braconi D, Amato L, Bernardini G, Arena S, Orlandini M, Scaloni A, Santucci A. 2011. Surfome analysis of a wild-type wine *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Food Microbiol* 28: 1220-1230.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brouwer N, Dolman KM, van Houdt M, Sta M, Roos D, Kuijpers TW. 2008. Mannose-binding lectin (MBL) facilitates opsonophagocytosis of yeasts but not of bacteria despite MBL binding. *J Immunol* 180: 4124-4132.
- Brown AJ, Odds FC, Gow NA. 2007. Infection-related gene expression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 10: 307-313.
- Brown GD. 2006. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* 6: 33-43.
- Brueske CH. 1986. Proteolytic activity of a clinical isolate of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 23: 631-633.
- Bucki R, Georges PC, Espinassous Q, Funaki M, Pastore JJ, Chaby R, Janmey PA. 2005. Inactivation of endotoxin by human plasma gelsolin. *Biochemistry* 44: 9590-9597.
- Bukau B, Horwich AL. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92: 351-366.
- Buts JP, Dekeyser N, Stilmant C, Delem E, Smets F, Sokal E. 2006. *Saccharomyces boulardii* produces in rat small intestine a novel protein phosphatase that inhibits *Escherichia coli* endotoxin by dephosphorylation. *Pediatr Res* 60: 24-29.
- Byron JK, Clemons KV, McCusker JH, Davis RW, Stevens DA. 1995. Pathogenicity of *Saccharomyces cerevisiae* in complement factor five-deficient mice. *Infect Immun* 63: 478-485.
- Cabezón V. 2009. Respuesta de *Candida albicans* tras su interacción con el macrófago: análisis proteómico y estudio de marcadores de apoptosis. Tesis doctoral.
- Cabib E, Blanco N, Grau C, Rodríguez-Peña JM, Arroyo J. 2007. Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to beta(1-6)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol* 63: 921-935.
- Cabib E, Farkas V, Kosik O, Blanco N, Arroyo J, McPhie P. 2008. Assembly of the yeast cell wall. Crh1p and Crh2p act as transglycosylases in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 283: 29859-29872.
- Cambi A, Gijzen K, de Vries JM, Torensma R, Joosten B, Adema GJ, Netea MG, Kullberg BJ, Romani L, Figdor CG. 2003. The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol* 33: 532-538.
- Cañas B, López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, Camafeita E, Calvo E. 2006. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic* 4: 295-320.
- Carlson M, Taussig R, Kustu S, Botstein D. 1983. The secreted form of invertase in *Saccharomyces cerevisiae* is synthesized from mRNA encoding a signal sequence. *Mol Cell Biol* 3: 439-447.
- Carmona-Sáez P, Chagoyen M, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A. 2007. GENECODIS:

- a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol* 8: R3.
- Caro LH, Tettelin H, Vossen JH, Ram AF, van den Ende H, Klis FM. 1997. In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13: 1477-1489.
- Casadevall A. 1995. Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infect Immun* 63: 4211-4218.
- Cassone M, Serra P, Mondello F, Girolamo A, Scafetti S, Pistella E, Venditti M. 2003. Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype *boulardii* fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism. *J Clin Microbiol* 41: 5340-5343.
- Castagliuolo I, LaMont JT, Qiu B, Nikulasson ST, Pothoulakis C. 1996. A receptor decoy inhibits the enterotoxic effects of *Clostridium difficile* toxin A in rat ileum. *Gastroenterology* 111: 433-438.
- Cheng L, Hirst K, Piper PW. 1992. Authentic temperature-regulation of a heat shock gene inserted into yeast on a high copy number vector. Influences of overexpression of HSP90 protein on high temperature growth and thermotolerance. *Biochim Biophys Acta*. 1132: 26-34.
- Cimolai N, Gill MJ, Church D. 1987. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: case report and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 8: 113-117.
- Clemons KV, Hanson LC, Stevens DA. 1996. Colony phenotype switching in clinical and non-clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Med Vet Mycol* 34: 259-264.
- Clemons KV, McCusker JH, Davis RW, Stevens DA. 1994. Comparative pathogenesis of clinical and nonclinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Infect Dis* 169: 859-867.
- Clemons KV, Salonen JH, Issakainen J, Nikoskelainen J, McCullough MJ, Jorge JJ, Stevens DA. 2010. Molecular epidemiology of *Saccharomyces cerevisiae* in an immunocompromised host unit. *Diagn Microbiol Infect Dis* 68: 220-227.
- Coler RN, Skeiky YA, Bernards K, Greeson K, Carter D, Cornellison CD, Modabber F, Campos-Neto A, Reed SG. 2002. Immunization with a polypeptide vaccine consisting of the T-Cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania* major stress-inducible protein 1, and *Leishmania* elongation initiation factor protects against leishmaniasis. *Infect Immun* 70: 4215-4225.
- Collette JR, Lorenz MC. 2011. Mechanisms of immune evasion in fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol* 14: 668-675.
- Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, Ho AW, Hai JH, Yu JJ, Jung JW, Filler SG, Masso-Welch P, Edgerton M, Gaffen SL. 2009. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* 206: 299-311.
- Cramer R, Blaser K. 2002. Allergy and immunity to fungal infections and colonization. *Eur Respir J* 19: 151-157.
- Crowe JD, Sievwright IK, Auld GC, Moore NR, Gow NA, Booth NA. 2003. *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Mol Microbiol* 47: 1637-1651.
- Cullen PJ, Sprague GF, Jr. 2000. Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13619-13624.
- Curtis MM, Way SS. 2009. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* 126: 177-185.
- Curwin AJ, Fairn GD, McMaster CR. 2009. Phospholipid transfer protein Sec14 is required for trafficking from endosomes and regulates distinct trans-Golgi export pathways. *J Biol Chem* 284: 7364-7375.
- Czerucka D, Rampal P. 2002. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes Infect* 4: 733-739.
- Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol*

Biol Rev 62: 130-180.

Chai LY, Netea MG, Vonk AG, Kullberg BJ. 2009. Fungal strategies for overcoming host innate immune response. *Med Mycol* 47: 227-236.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 183: 5385-5394.

Chen RE, Thorner J. 2007. Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1311-1340.

Chitasombat MN, Kofteridis DP, Jiang Y, Tarrand J, Lewis RE, Kontoyiannis DP. 2012. Rare opportunistic (non-*Candida*, non-*Cryptococcus*) yeast bloodstream infections in patients with cancer. *J Infect* 64: 68-75.

De Groot PW, Hellingwerf KJ, Klis FM. 2003. Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* 20: 781-796.

de la Fuente JM, Álvarez A, Nombela C, Sánchez M. 1992. Flow cytometric analysis of *Saccharomyces cerevisiae* autolytic mutants and protoplasts. *Yeast* 8: 39-45.

de Llanos R. 2007. Estudio comparativo entre aislados clínicos y no clínicos de *Saccharomyces cerevisiae* y su papel como patógeno emergente. Tesis doctoral.

de Llanos R, Fernández-Espinar MT, Querol A. 2006. A comparison of clinical and food *Saccharomyces cerevisiae* isolates on the basis of potential virulence factors. *Antonie Van Leeuwenhoek* 90: 221-231.

de Llanos R, Querol A, Planes AM, Fernández-Espinar MT. 2004. Molecular characterization of clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates and their association with non-clinical strains. *Syst Appl Microbiol* 27: 427-435.

de Llanos R, Hernández-Haro C, Barrio E, Querol A, Fernández-Espinar MT, Molina M. 2010. Differences in activation of MAP kinases and variability in the polyglutamine tract of Slt2 in clinical and non-clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 27: 549-561.

de Llanos R, Llopis S, Molero G, Querol A, Gil C, Fernández-Espinar MT. 2011. In vivo virulence of commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains with pathogenicity-associated phenotypical traits. *Int J Food Microbiol* 144: 393-399.

de Vrese M, Schrezenmeir J. 2008. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 111: 1-66.

Delgado ML, O'Connor JE, Azorin I, Renau-Piqueras J, Gil ML, Gozalbo D. 2001. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TDH1, TDH2 and TDH3 genes are also cell wall proteins. *Microbiology* 147: 411-417.

Delgado ML, Gil ML, Gozalbo D. 2003. *Candida albicans* TDH3 gene promotes secretion of internal invertase when expressed in *Saccharomyces cerevisiae* as a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-invertase fusion protein. *Yeast* 20: 713-722.

Delom F, Szponarski W, Sommerer N, Boyer JC, Bruneau JM, Rossignol M, Gibrat R. 2006. The plasma membrane proteome of *Saccharomyces cerevisiae* and its response to the antifungal calcofluor. *Proteomics* 6: 3029-3039.

Dickinson JR. 2008. Filament formation in *Saccharomyces cerevisiae*--a review. *Folia Microbiol (Praha)*. 2008;53:3-14.

Díez-Orejas R, Molero G, Navarro-García F, Pla J, Nombela C, Sánchez-Pérez M. 1997. Reduced virulence of *Candida albicans* MKC1 mutants: a role for mitogen-activated protein kinase in pathogenesis. *Infect Immun*. 65: 833-7.

Diezmann S, Dietrich FS. 2009. *Saccharomyces cerevisiae*: population divergence and resistance to oxidative stress in clinical, domesticated and wild isolates. *PLoS One* 4: e5317.

Diezmann S, Dietrich FS. 2011. Oxidative stress survival in a clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolate is influenced by a major quantitative trait nucleotide. *Genetics* 188: 709-722.

Ding K, Shibui A, Wang Y, Takamoto M, Matsuguchi T, Sugane K. 2005. Impaired recognition

- by Toll-like receptor 4 is responsible for exacerbated murine *Pneumocystis pneumonia*. *Microbes Infect* 7: 195-203.
- Dodds ES, Drew RH, Perfect JR. 2000. Antifungal pharmacodynamics: review of the literature and clinical applications. *Pharmacotherapy*. 20: 1535-55.
- Douglas LJ. 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* 11: 30-36.
- Ducluzeau R, Bensaada M. 1982. Comparative effect of a single or continuous administration of "*Saccharomyces boulardii*" on the establishment of various strains of "*candida*" in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Ann Microbiol (Paris)* 133: 491-501.
- Ecker M, Deutzmann R, Lehle L, Mrsa V, Tanner W. 2006. Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to beta-1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J Biol Chem* 281: 11523-11529.
- el-Azizi M, Khardori N. 1999. Factors influencing adherence of *Candida spp.* to host tissues and plastic surfaces. *Indian J Exp Biol* 37: 941-951.
- Enache-Angoulvant A, Hennequin C. 2005. Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review. *Clin Infect Dis* 41: 1559-1568.
- Fernández-Arenas E, Molero G, Nombela C, Diez-Orejas R, Gil C. 2004. Contribution of the antibodies response induced by a low virulent *Candida albicans* strain in protection against systemic candidiasis. *Proteomics* 4: 1204-1215.
- Fernández-Arenas E, Cabezón V, Bermejo C, Arroyo J, Nombela C, Diez-Orejas R, Gil C. 2007. Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into *Candida albicans* response upon macrophage interaction. 6: 460-78.
- Fleet G. 2006a. The commercial and Community Significance of yeast in Food and Beverage Production. En: *Yeast in Food and Beverages*, (eds) Querol, A y Fleet, GH. The Yeast Handbook Springer, Germany. pp 1-12.
- Fleet G y Roostita B. 2006b. The public health and probiotic significance of yeast in foods and beverages. En: *Yeast in Food and Beverages*, (eds) Querol, A y Fleet, GH. The Yeast Handbook Springer, Germany. pp 381-397.
- Fradin C, Kretschmar M, Nichterlein T, Gaillardin C, d'Enfert C, Hube B. 2003. Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* 47: 1523-1543.
- Fradin C, De Groot P, MacCallum D, Schaller M, Klis F, Odds FC, Hube B. 2005. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* 56: 397-415.
- Gagiano M, Bauer FF, Pretorius IS. 2002. The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 2: 433-470.
- Gancedo JM. 2001. Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 25: 107-123.
- Gao M, Qi D, Zhang P, Deng C, Zhang X. 2010. Development of multidimensional liquid chromatography and application in proteomic analysis. *Expert Rev Proteomics* 7: 665-678.
- García R, Bermejo C, Grau C, Pérez R, Rodríguez-Peña JM, Francois J, Nombela C, Arroyo J. 2004. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem* 279: 15183-15195.
- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11: 4241-4257.
- GE Healthcare. 2004. 2D-Electrophoresis, Principles and Methods. Handbook 80-6429-60AC.
- GE Healthcare. 2005. Ettan DIGE system, User Manual. User Manual 18-1173-17 A.
- Ghannoum MA. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13: 122-143, table of contents.
- Gigliotti F, Hughes WT. 1988. Passive immunoprophylaxis with specific monoclonal antibody confers partial protection against *Pneumocystis carinii pneumonia* in animal models. *J Clin*

Invest 81: 1666-1668.

Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR. 1984. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* 198: 179-182.

Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR. 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* 68: 1077-1090.

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274: 546, 563-547.

Goldstein AL, McCusker JH. 2001. Development of *Saccharomyces cerevisiae* as a model pathogen. A system for the genetic identification of gene products required for survival in the mammalian host environment. *Genetics* 159: 499-513.

González-Novo A, Labrador L, Jiménez A, Sánchez-Pérez M, Jiménez J. 2006. Role of the septin Cdc10 in the virulence of *Candida albicans*. *Microbiol Immunol* 50: 499-511.

Gow NA, Netea MG, Munro CA, Ferwerda G, Bates S, Mora-Montes HM, Walker L, Jansen T, Jacobs L, Tsoni V, Brown GD, Odds FC, Van der Meer JW, Brown AJ, Kullberg, B. J. 2007. Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. *J Infect Dis* 196: 1565-1571.

Gozalbo D, Gil-Navarro I, Azorin I, Renau-Piqueras J, Martínez JP, Gil ML. 1998. The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect Immun* 66: 2052-2059.

Graves PR, Haystead TA. 2002. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 39-63; table of contents.

Green R, Lesage G, Sdicu AM, Menard P, Bussey H. 2003. A synthetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* stress sensor Mid2p, and identification of a Mid2p-interacting protein, Zeo1p, that modulates the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *Microbiology* 149: 2487-2499.

Groll AH, De Lucca AJ, Walsh TJ. 1998a. Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. *Trends Microbiol.* 6: 117-24.

Groll AH, Piscitelli SC, Walsh TJ. 1998b. Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: a comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds, and putative targets for antifungal drug development. *Adv Pharmacol.* 44: 343-500.

Guerrero A, Fries BC. 2008. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* contributes to virulence by changing the immunological host response. *Infect Immun* 76: 4322-4331.

Guo Y, Fu Z, Van Eyk JE. 2007. A proteomic primer for the clinician. *Proc Am Thorac Soc* 4: 9-17.

Hamada K, Terashima H, Arisawa M, Yabuki N, Kitada K. 1999. Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. *J Bacteriol* 181: 3886-3889.

Harmsen AG, Chen W, Gigliotti F. 1995. Active immunity to *Pneumocystis carinii* reinfection in T-cell-depleted mice. *Infect Immun* 63: 2391-2395.

Hartl FU. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571-579.

Hashimoto H, Sakakibara A, Yamasaki M, Yoda K. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* VIG9 encodes GDP-mannose pyrophosphorylase, which is essential for protein glycosylation. *J Biol Chem* 272: 16308-16314.

Hazen KC. 1995. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 8: 462-478.

Hedbacker K, Carlson M. 2008. SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front Biosci* 13: 2408-2420.

Hennequin C, Kauffmann-Lacroix C, Jobert A, Viard JP, Ricour C, Jacquemin JL, Berche P. 2000. Possible role of catheters in *Saccharomyces boulardii* fungemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19: 16-20.

Hernández ML, Ximénez-Embún P, Martínez-Gomáriz M, Gutiérrez-Blázquez MD, Nombela C, Gil

- C. 2010. Identification of *Candida albicans* exposed surface proteins in vivo by a rapid proteomic approach. *J Proteomics* 73: 1404-1409.
- Herrero E, Ros J, Belli G, Cabisco E. 2008. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 1780: 1217-1235.
- Hitomi Y, Yoshida M, Nakamura T, Shirasu Y. 2002a. Effects of brewer's yeast cell wall on serum lipid levels in rats fed a high cholesterol and fat diet. *J Oleo Sci* 51: 141-144.
- Hitomi Y, Yoshida M, Mizutani M, Nakamura T, Shirasu Y, Shimasaki H. 2002b. Effects of Brewer's Yeast Cell Wall on Fecal Steroid Excretion in Rats. *J Oleo Sci* 51: 335-346.
- Hodgetts S, Matthews R, Morrissey G, Mitsutake K, Piper P, Burnie J. 1996. Over-expression of *Saccharomyces cerevisiae* hsp90 enhances the virulence of this yeast in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 16: 229-234.
- Hong SP, Carlson M. 2007. Regulation of snf1 protein kinase in response to environmental stress. *J Biol Chem* 282: 16838-16845.
- Hoyer LL. 2001. The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 9: 176-180.
- Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. 2004. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* 190: 624-631.
- Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK. 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425: 686-691.
- Iborra S, Soto M, Carrion J, Nieto A, Fernández E, Alonso C, Requena JM. 2003. The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Infect Immun* 71: 6562-6572.
- Insenser MR, Hernáez ML, Nombela C, Molina M, Molero G, Gil C. 2010. Gel and gel-free proteomics to identify *Saccharomyces cerevisiae* cell surface proteins. *J Proteomics* 73: 1183-1195.
- Issaq H, Veenstra T. 2008. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques*. 44: 697-8.
- Jaehrig SC, Rohn S, Kroh LW, Fleischer LG, Kurz T. 2007. In vitro potential antioxidant activity of (1-->3),(1-->6)-beta-D-glucan and protein fractions from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J Agric Food Chem* 55: 4710-4716.
- Jain N, Guerrero A, Fries BC. 2006. Phenotypic switching and its implications for the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res* 6: 480-488.
- Jeng HW, Holmes AR, Cannon RD. 2005. Characterization of two *Candida albicans* surface mannoprotein adhesins that bind immobilized saliva components. *Med Mycol* 43: 209-217.
- Jensen DP, Smith DL. 1976. Fever of unknown origin secondary to brewer's yeast ingestion. *Arch Intern Med* 136: 332-333.
- Jensen ON. 2004. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol*. 8:33-41.
- Jong AY, Chen SH, Stins MF, Kim KS, Tuan TL, Huang SH. 2003. Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol* 52: 615-622.
- Jouault T, El Abed-El Behi M, Martínez-Esparza M, Breuilh L, Trinel PA, Chamaillard M, Trottein F, Poulain D. 2006. Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *J Immunol* 177: 4679-4687.
- Kaminishi H, Miyaguchi H, Tamaki T, Suenaga N, Hisamatsu M, Mihashi I, Matsumoto H, Maeda H, Hagihara Y. 1995. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun* 63: 984-988.
- Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. 2009. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol* 56: 211-224.
- Kery V, Krepinsky JJ, Warren CD, Capek P, Stahl PD. 1992. Ligand recognition by purified

human mannose receptor. Arch Biochem Biophys 298: 49-55.

Kim SW, Joo YJ, Kim J. 2010. Asc1p, a ribosomal protein, plays a pivotal role in cellular adhesion and virulence in *Candida albicans*. J Microbiol 48: 842-848.

Kleinschek MA, Muller U, Brodie SJ, Stenzel W, Kohler G, Blumenschein WM, Straubinger RK, McClanahan T, Kastelein RA, Alber G. 2006. IL-23 enhances the inflammatory cell response in *Cryptococcus neoformans* infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12. J Immunol 176: 1098-1106.

Klingberg TD, Lesnik U, Arneborg N, Raspor P, Jespersen L. 2008. Comparison of *Saccharomyces cerevisiae* strains of clinical and nonclinical origin by molecular typing and determination of putative virulence traits. FEMS Yeast Res. 8: 631-40.

Klippel N, Cui S, Groebe L, Bilitewski U. 2010. Deletion of the *Candida albicans* histidine kinase gene CHK1 improves recognition by phagocytes through an increased exposure of cell wall beta-1,3-glucans. Microbiology 156: 3432-3444.

Klis FM, Boorsma A, De Groot PW. 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 23: 185-202.

Klotz SA, Pendrak ML, Hein RC. 2001. Antibodies to alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins react with *Candida albicans* alcohol dehydrogenase. Microbiology 147: 3159-3164.

Klotz SA, Hein RC, Smith RL, Rouse JB. 1994. The fibronectin adhesin of *Candida albicans*. Infect Immun 62: 4679-4681.

Kojic EM, Darouiche RO. 2004. *Candida* infections of medical devices. Clin Microbiol Rev 17: 255-267.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. 2009. IL-17 and Th17 Cells. Annu Rev Immunol 27: 485-517.

Kozel TR, Weinhold LC, Lupan DM. 1996. Distinct characteristics of initiation of the classical and alternative complement pathways by *Candida albicans*. Infect Immun 64: 3360-3368.

Kumar A, Agarwal S, Heyman JA, Matson S, Heidtman M, Piccirillo S, Umansky L, Drawid A, Jansen R, Liu Y, Cheung KH, Miller P, Gerstein M, Roeder GS, Snyder M. 2002. Subcellular localization of the yeast proteome. Genes Dev 16: 707-719.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. 1992. *Saccharomyces* Meyen Ex Reess. En: Medical mycology, (ed) Kwon-Chung, JJ. y Bennett, E. Philadelphia, Lea and Febiger. pp. 772-773.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Lambrechts MG, Bauer FF, Marmur J, Pretorius IS. 1996. Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 8419-8424.

Latge JP. 2001. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. Trends Microbiol 9: 382-389.

Leberer E, Wu C, Leeuw T, Fourest-Lieuvin A, Segall JE, Thomas DY. 1997. Functional characterization of the Cdc42p binding domain of yeast Ste20p protein kinase. Embo J 16: 83-97.

Lee J, Godon C, Lagniel G, Spector D, Garin J, Labarre J, Toledano MB. 1999. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. J Biol Chem 274: 16040-16046.

Lee YJ, Hoe KL, Maeng PJ. 2007. Yeast cells lacking the CIT1-encoded mitochondrial citrate synthase are hypersusceptible to heat- or aging-induced apoptosis. Mol Biol Cell 18: 3556-3567.

Lemaire K, Van de Velde S, Van Dijck P, Thevelein JM. 2004. Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell 16: 293-299.

Lesage G, Bussey H. 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev 70: 317-343.

Levin DE. 2011. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. Genetics 189: 1145-1175.

- Lherm T, Monet C, Nougier B, Soulier M, Larbi D, Le Gall C, Caen D, Malbrunot C. 2002. Seven cases of fungemia with *Saccharomyces boulardii* in critically ill patients. *Intensive Care Med* 28: 797-801.
- Lim D, Hains P, Walsh B, Bergquist P, Nevalainen H. 2001. Proteins associated with the cell envelope of *Trichoderma reesei*: a proteomic approach. *Proteomics* 1: 899-909.
- Lin L, Ibrahim AS, Xu X, Farber JM, Avanesian V, Baquir B, Fu Y, French SW, Edwards JE, Jr., Spellberg B. 2009. Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. *PLoS Pathog* 5: e1000703.
- Lindquist S, Kim G. 1996. Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5301-5306.
- Lolis N, Veldekis D, Moraitou H, Kanavaki S, Velegraki A, Triandafyllidis C, Tasioudis C, Pefanis A, Pneumatikos I. 2008. *Saccharomyces boulardii* fungaemia in an intensive care unit patient treated with caspofungin. *Crit Care* 12: 414.
- López-Ribot JL, Chaffin WL. 1996. Members of the Hsp70 family of proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 178: 4724-4726.
- López-Villar E, Monteoliva L, Larsen MR, Sachon E, Shabaz M, Pardo M, Pla J, Gil C, Roepstorff P, Nombela C. 2006. Genetic and proteomic evidences support the localization of yeast enolase in the cell surface. *Proteomics*. 6 Suppl 1: S107-18.
- Lorenz MC, Fink GR. 2001. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* 412: 83-86.
- Lorenz MC, Fink GR. 2002. Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot Cell* 1: 657-662.
- Lorenz MC, Cutler NS, Heitman J. 2000. Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 11: 183-199.
- Luberto C, Martínez-Marino B, Taraskiewicz D, Bolanos B, Chitano P, Toffaletti DL, Cox GM, Perfect JR, Hannun YA, Balish E, Del Poeta M. 2003. Identification of App1 as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest* 112: 1080-1094.
- Luo S, Hoffmann R, Skerka C, Zipfel PF. 2013. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 is a novel factor H-, factor H-like protein 1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. *J Infect Dis* 207: 594-603.
- Luo S, Poltermann S, Kunert A, Rupp S, Zipfel PF. 2009. Immune evasion of the human pathogenic yeast *Candida albicans*: Pra1 is a Factor H, FHL-1 and plasminogen binding surface protein. *Mol Immunol* 47: 541-550.
- Llopis S. 2012. Estudio del potencial patógeno de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de suplementos dietéticos y probióticos. Tesis doctoral.
- Llopis S, Hernández-Haro C, Monteoliva L, Querol A, Molina M, Fernández-Espinar MT. 2013. Pathogenic potential of *Saccharomyces cerevisiae* strains of isolated from dietary supplements. Enviado a PLOS ONE.
- Llopis S, Querol A, Heyken A, Hube B, Jespersen L, Fernández-Espinar MT, Pérez-Torrado R. 2012. Transcriptomics in human blood incubation reveals the importance of oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae* clinical strains. *BMC Genomics* 13: 419.
- Maresca B, Kobayashi GS. 1994. Hsp70 in parasites: as an inducible protective protein and as an antigen. *Experientia* 50: 1067-1074.
- Marques MA, Chitale S, Brennan PJ, Pessolani MC. 1998. Mapping and identification of the major cell wall-associated components of *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun* 66: 2625-2631.
- Marteau P, Boutron-Ruault MC. 2002. Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. *Br J Nutr* 87 Suppl 2: S153-157.
- Martín H, Flández M, Nombela C, Molina M. 2005. Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *Mol Microbiol* 58: 6-16.
- Martín H, Rodríguez-Pachón JM, Ruiz C, Nombela C, Molina M. 2000. Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in

Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 275: 1511-1519.

Martínez-López R, Nombela C, Diez-Orejas R, Monteoliva L, Gil C. 2008. Immunoproteomic analysis of the protective response obtained from vaccination with *Candida albicans* ecm33 cell wall mutant in mice. Proteomics 8: 2651-2664.

Martínez JP, Gil ML, López-Ribot JL, Chaffin WL. 1998. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. Clin Microbiol Rev 11: 121-141.

Matthews R, Burnie J. 1996. Antibodies against *Candida*: potential therapeutics? Trends Microbiol 4: 354-358.

Matthews R, Burnie J, Smith D, Clark I, Midgley J, Conolly M, Gazzard B. 1988. *Candida* and AIDS: evidence for protective antibody. Lancet 2: 263-266.

Matthews RC, Burnie JP, Howat D, Rowland T, Walton F. 1991. Autoantibody to heat-shock protein 90 can mediate protection against systemic candidosis. Immunology 74: 20-24.

McCullough MJ, Clemons KV, Farina C, McCusker JH, Stevens DA. 1998. Epidemiological investigation of vaginal *Saccharomyces cerevisiae* isolates by a genotypic method. J Clin Microbiol 36: 557-562.

McCusker JH, Clemons KV, Stevens DA, Davis RW. 1994a. Genetic characterization of pathogenic *Saccharomyces cerevisiae* isolates. Genetics 136: 1261-1269.

McCusker JH, Clemons KV, Stevens DA, Davis RW. 1994b. *Saccharomyces cerevisiae* virulence phenotype as determined with CD-1 mice is associated with the ability to grow at 42 degrees C and form pseudohyphae. Infect Immun 62: 5447-5455.

McFarland LV. 2010. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. World J Gastroenterol 16: 2202-2222.

McFarland LV, Bernasconi P. 1993. *Saccharomyces boulardii*: a review of an innovative biotherapeutic agent. Microb Ecol Health Dis. 6: 157-171.

McGovern PE, Glusker DL, Exner LJ, Voigt MM. 1996. Neolithic resinated wine. Nature 381: 480-481.

McGovern PE, Zhang J, Tang J, Zhang Z, Hall GR, Moreau RA, Nuñez A, Butrym ED, Richards MP, Wang CS, Cheng G, Zhao Z, Wang C. 2004. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 17593-17598.

McKinney JD, Honer zu Bentrup K, Muñoz-Elias EJ, Miczak A, Chen B, Chan WT, Swenson D, Sacchetti JC, Jacobs WR, Jr., Russell DG. 2000. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. Nature 406: 735-738.

Meier A, Kirschning CJ, Nikolaus T, Wagner H, Heesemann J, Ebel F. 2003. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. Cell Microbiol 5: 561-570.

Meri T, Blom AM, Hartmann A, Lenk D, Meri S, Zipfel PF. 2004. The hyphal and yeast forms of *Candida albicans* bind the complement regulator C4b-binding protein. Infect Immun 72: 6633-6641.

Merkel O, Fido M, Mayr JA, Pruger H, Raab F, Zandonella G, Kohlwein SD, Paltauf F. 1999. Characterization and function in vivo of two novel phospholipases B/lysophospholipases from *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 274: 28121-28127.

Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. 2011. Emerging opportunistic yeast infections. Lancet Infect Dis 11: 142-151.

Mishra NN, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK, Singh R. 2007. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. Acta Microbiol Immunol Hung 54: 201-235.

Miyake T, Sammoto H, Ono B. 2003. Acivicin induce filamentous growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci Biotechnol Biochem 67: 2283-2285.

Molina M, Cid VJ, Martín H. 2010. Fine regulation of *Saccharomyces cerevisiae* MAPK pathways by post-translational modifications. Yeast 27: 503-511.

Monteoliva L. 2008. Proteómica: presente y futuro en la investigación biomédica. Industria

Farmacéutica. 139: 78-86.

Monteoliva L, Albar JP. 2004. Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches. *Brief Funct Genomic Proteomic* 3: 220-239.

Monteoliva L, Martínez-López R, Pitarch A, Hernáez ML, Serna A, Nombela C, Albar JP, Gil C. 2011. Quantitative proteome and acidic subproteome profiling of *Candida albicans* yeast-to-hypha transition. *J Proteome Res* 10: 502-517.

Moseley P. 2000. Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology* 48: 299-302.

Mouyna I, Fontaine T, Vai M, Monod M, Fonzi WA, Diaquin M, Popolo L, Hartland RP, Latge JP. 2000. Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanotransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J Biol Chem*. 275: 14882-9.

Moyad MA. 2007. Brewer's/baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and preventive medicine: part I. *Urol Nurs* 27: 560-561.

Moyad MA. 2008. Brewer's/baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and preventive medicine: Part II. *Urol Nurs* 28: 73-75.

Mrsa V, Tanner W. 1999. Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast* 15: 813-820.

Muller LA, Lucas JE, Georgianna DR, McCusker JH. 2011. Genome-wide association analysis of clinical vs. nonclinical origin provides insights into *Saccharomyces cerevisiae* pathogenesis. *Mol Ecol* 20: 4085-4097.

Muñoz Bellido JL, Vega Castano S, Ferreira L, Sánchez Juanes F, González Buitrago JM. 2012. Proteomic applications in the Clinical Microbiology laboratory. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 30: 383-393.

Muñoz P, Bouza E, Cuenca-Estrella M, Eiros JM, Pérez MJ, Sánchez-Somolinos M, Rincón C, Hortal J, Peláez T. 2005. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: an emerging infectious disease. *Clin Infect Dis* 40: 1625-1634.

Murphy A, Kavanagh K. 1999. Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen, Implications for biotechnology. *Enz Microbial Technol*. 25: 551-557.

Murphy AR, Kavanagh KA. 2001. Adherence of clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae* to buccal epithelial cells. *Med Mycol* 39: 123-127.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. 2003. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 400-428, table of contents.

Nakamura T, Nishida S, Mizutani M, Iino H. 2001a. Effects of yogurt supplemented with brewer's yeast cell wall on constipation and intestinal microflora in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 47: 367-372.

Nakamura T, Agata K, Mizutani M, Iino H. 2001b. Effects of brewer's yeast cell wall on constipation and defecation in experimentally constipated rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 774-780.

Nakamura T, Hitomi Y, Yoshida M, Shirasu Y, Tsukui T, Shimasaki H. 2002. Effect of yogurt supplemented with Brewer's Yeast Cell wall on levels of blood lipids in normal and hypercholesterolemic adults. *J Oleo Sci* 51: 323-334.

Nakashimada Y, Michinaka A, Watanabe K, Nishio N, Fujii T. 2011. Brewer's yeast cell wall affects microbiota composition and decreases *Bacteroides fragilis* populations in an anaerobic gut intestinal model. *J Biosci Bioeng* 111: 178-184.

Netea MG, Ferwerda G, van der Graaf CA, Van der Meer JW, Kullberg BJ. 2006. Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors. *Curr Pharm Des* 12: 4195-4201.

Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, Van Der Meer JW, Kullberg BJ. 2002. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis* 185: 1483-1489.

Neth O, Jack DL, Dodds AW, Holzel H, Klein NJ, Turner MW. 2000. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition.

Infect Immun 68: 688-693.

Nett J, Andes D. 2006. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. Curr Opin Microbiol 9: 340-345.

Nombela C, Gil C, Chaffin WL. 2006. Non-conventional protein secretion in yeast. Trends Microbiol 14: 15-21.

Nosaka K, Kaneko Y, Nishimura H, Iwashima A. 1989. A possible role for acid phosphatase with thiamin-binding activity encoded by PHO3 in yeast. FEMS Microbiol Lett 51: 55-59.

Nyirjesy P, Vázquez JA, Ufberg DD, Sobel JD, Boikov DA, Buckley HR. 1995. *Saccharomyces cerevisiae* vaginitis: transmission from yeast used in baking. Obstet Gynecol 86: 326-329.

O'Rourke SM, Herskowitz I. 1998. The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev 12: 2874-2886.

Odds EC. 1997. Switch of phenotype as an escape mechanism of the intruder. Mycoses. 40 Suppl 2:9-12.

Odds FC. 1988. Candidosis of the gastrointestinal tract. *Candida* and candidosis. London, United Kingdom: Baillière Tindal.

Oliveira SC, Splitter GA. 1996. Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. Vaccine 14: 959-962.

Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M. 2002. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. Mol Cell Proteomics 1: 376-386.

Orlean P. 2012. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. Genetics 192: 775-818.

Orlova M, Ozcetin H, Barrett L, Kuchin S. 2010. Roles of the Snf1-activating kinases during nitrogen limitation and pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot Cell 9: 208-214.

Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 13766-13771.

Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ. 1993. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. Curr Biol 3: 327-332.

Pardo M, Monteoliva L, Pla J, Sánchez M, Gil C, Nombela C. 1999. Two-dimensional analysis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenerating protoplasts: a novel approach to study the cell wall. Yeast 15: 459-472.

Pardo M, Ward M, Bains S, Molina M, Blackstock W, Gil C, Nombela C. 2000a. A proteomic approach for the study of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall biogenesis Electrophoresis. 21: 3396-410.

Pardo M, Ward M, Pitarch A, Sánchez M, Nombela C, Blackstock W, Gil C. 2000b. Cross-species identification of novel *Candida albicans* immunogenic proteins by combination of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. Electrophoresis 21: 2651-2659.

Parra CM. 2013. Estudio proteómico de la superficie celular de *Candida* spp: Aplicaciones biomédicas. Tesis doctoral.

Pasteur L. 1860. Me'moire sur la fermentation alcoolique. Annales de chimie et de physique 58: 323-426.

Patterson SD. 2001. Protein identification and characterization by mass spectrometry. Curr Protoc Mol Biol Chapter 10: Unit 10 22.

Patterson SD, Aebersold R. 1995. Mass spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins. Electrophoresis 16: 1791-1814.

Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. J Microbiol Methods. 72: 157-65.

- Perapoch J, Planes AM, Querol A, López V, Martínez-Bendayan I, Tormo R, Fernández F, Peguero G, Salcedo S. 2000. Fungemia with *Saccharomyces cerevisiae* in two newborns, only one of whom had been treated with ultra-levura. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19: 468-470.
- Pérez-Torrado R, Llopis S, Jespersen L, Fernández-Espinar T, Querol A. 2012. Clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates cannot cross the epithelial barrier in vitro. *Int J Food Microbiol* 157: 59-64.
- Perfect JR. 2006. *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer. Molecular principles of fungal pathogenesis. Washington DC: ASM Press.
- Peter M, Neiman AM, Park HO, van Lohuizen M, Herskowitz I. 1996. Functional analysis of the interaction between the small GTP binding protein Cdc42 and the Ste20 protein kinase in yeast. *Embo J* 15: 7046-7059.
- Pietrella D, Corbucci C, Perito S, Bistoni G, Vecchiarelli A. 2005. Mannoproteins from *Cryptococcus neoformans* promote dendritic cell maturation and activation. *Infect Immun* 73: 820-827.
- Pitarch A, Nombela C, Gil C. 2011. Prediction of the clinical outcome in invasive candidiasis patients based on molecular fingerprints of five anti-*Candida* antibodies in serum. *Mol Cell Proteomics* 10: M110 004010.
- Pitarch A, Sánchez M, Nombela C, Gil C. 2002. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol Cell Proteomics* 1: 967-982.
- Pitarch A, Jiménez A, Nombela C, Gil C. 2006. Decoding serological response to *Candida* cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses. *Mol Cell Proteomics* 5: 79-96.
- Pitarch A, Jiménez A, Nombela C, Gil C. 2008. Serological proteome analysis to identify systemic candidiasis patients in the intensive care unit: Analytical, diagnostic and prognostic validation of anti-*Candida* enolase antibodies on quantitative clinical platforms. *Proteomics Clin Appl* 2: 596-618.
- Pitarch A, Abian J, Carrascal M, Sánchez M, Nombela C, Gil C. 2004. Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. *Proteomics* 4: 3084-3106.
- Pitarch A, Pardo M, Jiménez A, Pla J, Gil C, Sánchez M, Nombela C. 1999. Two-dimensional gel electrophoresis as analytical tool for identifying *Candida albicans* immunogenic proteins. *Electrophoresis* 20: 1001-1010.
- Pitarch A, Díez-Orejas R, Molero G, Pardo M, Sánchez M, Gil C, Nombela C. 2001. Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model. *Proteomics* 1: 550-559.
- Pitt JI, Hocking AD. 1985. *Fungi and Food Spoilage*. Academic Press.
- Pittet M, Conzelmann A. 2007. Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1771: 405-420.
- Pockley AG. 2003. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet* 362: 469-476.
- Poltermann S, Kunert A, von der Heide M, Eck R, Hartmann A, Zipfel PF. 2007. Gpm1p is a factor H-, FHL-1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 282: 37537-37544.
- Pontón J, Ruchel R, Clemons KV, Coleman DC, Grillot R, Guarro J, Aldebert D, Ambroise-Thomas P, Cano J, Carrillo-Muñoz AJ, Gene J, Pinel C, Stevens DA, Sullivan DJ. 2000. Emerging pathogens. *Med Mycol* 38 Suppl 1: 225-236.
- Ragni E, Fontaine T, Gissi C, Latge JP, Popolo L. 2007. The Gas family of proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evolutionary analysis. *Yeast* 24: 297-308.
- Rauceo JM, De Armond R, Otoo H, Kahn PC, Klotz SA, Gaur NK, Lipke PN. 2006. Threonine-rich repeats increase fibronectin binding in the *Candida albicans* adhesin Als5p. *Eukaryot Cell* 5: 1664-1673.

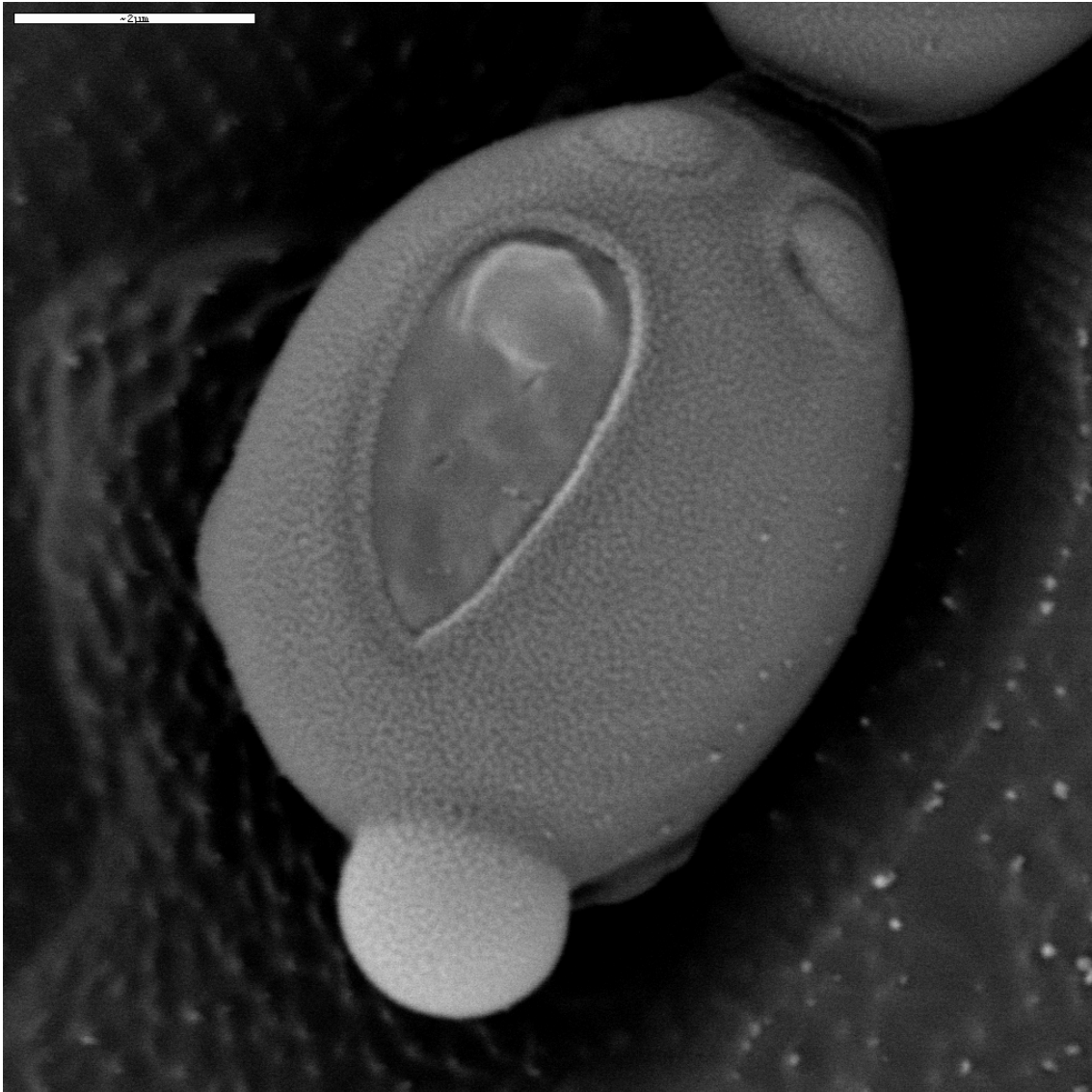
- Reales-Calderón JA, Martínez-Solano L, Martínez-Gomáriz M, Nombela C, Molero G, Gil C. 2012. Sub-proteomic study on macrophage response to *Candida albicans* unravels new proteins involved in the host defense against the fungus. *J Proteomics* 75: 4734-4746.
- Rementeria A, López-Molina N, Ludwig A, Vivanco AB, Bikandi J, Pontón J, Garaizar J. 2005. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol* 22: 1-23.
- Reynolds TB, Fink GR. 2001. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 291: 878-881.
- Ribeiro LA, Azevedo V, Le Loir Y, Oliveira SC, Dieye Y, Piard JC, Gruss A, Langella P. 2002. Production and targeting of the *Brucella abortus* antigen L7/L12 in *Lactococcus lactis*: a first step towards food-grade live vaccines against brucellosis. *Appl Environ Microbiol* 68: 910-916.
- Roberts RL, Fink GR. 1994. Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev.* 8: 2974-85.
- Roberts CJ, Nelson B, Marton MJ, Stoughton R, Meyer MR, Bennett HA, He YD, Dai H, Walker WL, Hughes TR, Tyers M, Boone C, Friend SH. 2000. Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science*. 287: 873-80.
- Robinson MD, Grigull J, Mohammad N, Hughes TR. 2002. FunSpec: a web-based cluster interpreter for yeast. *BMC Bioinformatics* 3: 35.
- Rodríguez-Ortega MJ, Norais N, Bensì G, Liberatori S, Capo S, Mora M, Scarselli M, Doro F, Ferrari G, Garaguso I, Maggi T, Neumann A, Covre A, Telford JL, Grandi G. 2006. Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A *Streptococcus* surface proteome. *Nat Biotechnol* 24: 191-197.
- Roetzer A, Klopff E, Gratz N, Marcet-Houben M, Hiller E, Rupp S, Gabaldon T, Kovarik P, Schuller C. 2010. Regulation of *Candida glabrata* oxidative stress resistance is adapted to host environment. *FEBS Lett* 585: 319-327.
- Romani L. 2004. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 4: 1-23.
- Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlett-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin DJ. 2004. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 3: 1154-1169.
- Rossignol T, Kelly B, Dobson C, d'Enfert C. 2011. Endocytosis-mediated vacuolar accumulation of the human ApoE apolipoprotein-derived ApoEdpL-W antimicrobial peptide contributes to its antifungal activity in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 4670-4681.
- Roths JB, Sidman CL. 1993. Single and combined humoral and cell-mediated immunotherapy of *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunodeficient scid mice. *Infect Immun* 61: 1641-1649.
- Rotrosen D, Calderone RA, Edwards JE, Jr. 1986. Adherence of *Candida* species to host tissues and plastic surfaces. *Rev Infect Dis* 8: 73-85.
- Rubin-Bejerano I, Fraser I, Grisafi P, Fink GR. 2003. Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11007-11012.
- Ruchel R. 1986. Cleavage of immunoglobulins by pathogenic yeasts of the genus *Candida*. *Microbiol Sci* 3: 316-319.
- Rude TH, Toffaletti DL, Cox GM, Perfect JR. 2002. Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 70: 5684-5694.
- Rudner XL, Happel KI, Young EA, Shellito JE. 2007. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun* 75: 3055-3061.
- Russell C, Rahman A, Mohammed AR. 2013. Application of genomics, proteomics and metabolomics in drug discovery, development and clinic. *Ther Deliv* 4: 395-413.

- Ryan O, Shapiro RS, Kurat CF, Mayhew D, Baryshnikova A, Chin B, Lin ZY, Cox MJ, Vizeacoumar F, Cheung D, Bahr S, Tsui K, Tebbji F, Sellam A, Istel F, Schwarzmuller T, Reynolds TB, Kuchler K, Gifford DK, Whiteway M, Giaever G, Nislow C, Costanzo M, Gingras AC, Mitra RD, Andrews B, Fink GR, Cowen LE, Boone C. 2012. Global gene deletion analysis exploring yeast filamentous growth. *Science* 337: 1353-1356.
- Sabino R, Verissimo C, Brandao J, Alves C, Parada H, Rosado L, Paixao E, Videira Z, Tendeiro T, Sampaio P, Pais C. 2010. Epidemiology of candidemia in oncology patients: a 6-year survey in a Portuguese central hospital. *Med Mycol* 48: 346-354.
- Sahu A, Lambris JD. 2001. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol Rev* 180: 35-48.
- Saijo S, Fujikado N, Furuta T, Chung SH, Kotaki H, Seki K, Sudo K, Akira S, Adachi Y, Ohno N, Kinjo T, Nakamura K, Kawakami K, Iwakura Y. 2007. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol* 8: 39-46.
- Salonen JH, Richardson MD, Gallacher K, Issakainen J, Helenius H, Lehtonen OP, Nikoskelainen J. 2000. Fungal colonization of haematological patients receiving cytotoxic chemotherapy: emergence of azole-resistant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Hosp Infect* 45: 293-301.
- Samuel D. 1996. Investigation of Ancient Egyptian Baking and Brewing Methods by Correlative Microscopy. *Science* 273: 488-490.
- Sandini S, Stringaro A, Arancia S, Colone M, Mondello F, Murtas S, Girolamo A, Mastrangelo N, De Bernardis F. 2011. The MP65 gene is required for cell wall integrity, adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Candida albicans*. *BMC Microbiol* 11: 106.
- Sato K, Yang XL, Yudate T, Chung JS, Wu J, Luby-Phelps K, Kimberly RP, Underhill D, Cruz PD, Jr., Ariizumi K. 2006. Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J Biol Chem* 281: 38854-38866.
- Savini V, Catavittello C, Manna A, Talia M, Febbo F, Balbinot A, D'Antonio F, Di Bonaventura G, Celentano C, Liberati M, Piccolomini R, D'Antonio, D. 2008. Two cases of vaginitis caused by itraconazole-resistant *Saccharomyces cerevisiae* and a review of recently published studies. *Mycopathologia* 166: 47-50.
- Sechi S, Chait BT. 1998. Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Anal Chem*. 70: 5150-8.
- Seider K, Heyken A, Luttich A, Miramon P, Hube B. 2010. Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. *Curr Opin Microbiol* 13: 392-400.
- Seliger B, Kellner R. 2002. Design of proteome-based studies in combination with serology for the identification of biomarkers and novel targets. *Proteomics* 2: 1641-1651.
- Serrano-Gómez D, Domínguez-Soto A, Ancochea J, Jiménez-Heffernan JA, Leal JA, Corbi AL. 2004. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *J Immunol* 173: 5635-5643.
- Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Shevchenko A, Boucherie H, Mann M. 1996. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14440-14445.
- Shoham S, Levitz SM. 2005. The immune response to fungal infections. *Br J Haematol* 129: 569-582.
- Singh, N. 2001. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. *Clin Infect Dis*. 33: 1692-6.
- Singh P, Ghosh S, Datta A. 2001. Attenuation of virulence and changes in morphology in *Candida albicans* by disruption of the N-acetylglucosamine catabolic pathway. *Infect Immun*. 69: 7898-903.
- Smith D, Metzgar D, Wills C, Fierer J. 2002. Fatal *Saccharomyces cerevisiae* aortic graft infection. *J. Clin. Microbiol*. 40: 2691-2692.

- Smith DL. 1996. Brewer's yeast as a cause of infection. Clin Infect Dis 22: 201.
- Sobel J, Vázquez J, Lynch M, Meriwether C, Zervos M. 1993. Vaginitis due to *Saccharomyces cerevisiae*: Epidemiology, Clinical aspects, and Therapy. Clin. Infect. Dis. 16: 93-99.
- Soll DR. 1988. High-frequency switching in *Candida albicans* and its relations to vaginal candidiasis. Am J Obstet Gynecol 158: 997-1001.
- Soll DR. 1992. High-frequency switching in *Candida albicans*. Clin Microbiol Rev 5: 183-203.
- Steele C, Rapaka RR, Metz A, Pop SM, Williams DL, Gordon S, Kolls JK, Brown GD. 2005. The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. PLoS Pathog 1: e42.
- Stein PD, Folkens AT, Hruska KA. 1970. *Saccharomyces* fungemia. Chest 58: 173-175.
- Steinbach WJ, Cramer RA, Jr, Perfect BZ, Asfaw YG, Sauer TC, Najvar LK, Kirkpatrick WR, Patterson TF, Benjamin DK, Jr, Heitman J, Perfect JR. 2006. Calcineurin controls growth, morphology, and pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. Eukaryot Cell 5: 1091-1103.
- Strausbaugh LJ, Sewell DL, Ward TT, Pfaller MA, Heitzman T, Tjoelker R. 1994. High frequency of yeast carriage on hands of hospital personnel. J Clin Microbiol 32: 2299-2300.
- Swinne D, Nolard N, P VANR, Detandt M. 2009. Bloodstream yeast infections: a 15-month survey. Epidemiol Infect 137: 1037-1040.
- Tada H, Nemoto E, Shimauchi H, Watanabe T, Mikami T, Matsumoto T, Ohno N, Tamura H, Shibata K, Akashi S, Miyake K, Sugawara S, Takada H. 2002. *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. Microbiol Immunol. 46: 503-12.
- Tavanti A, Campa D, Bertozzi A, Pardini G, Naglik JR, Barale R, Senesi S. 2006. *Candida albicans* isolates with different genomic backgrounds display a differential response to macrophage infection. Microbes Infect 8: 791-800.
- Tawfik OW, Papasian CJ, Dixon AY, Potter LM. 1989. *Saccharomyces cerevisiae* pneumonia in a patient with acquired immune deficiency syndrome. J Clin Microbiol 27: 1689-1691.
- Tekaia F, Latge JP. 2005. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? Curr Opin Microbiol 8: 385-392.
- Theis T, Stahl U. 2004. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. Cell Mol Life Sci. 61: 437-55.
- Thomas BJ, Rothstein R. 1989. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. Cell 56: 619-630.
- Tiago FC, Martins FS, Souza EL, Pimenta PF, Araujo HR, Castro IM, Brandao RL, Nicoli JR. 2012. Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. J Med Microbiol 61: 1194-1207.
- Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J, Pognan F, Hawkins E, Currie I, Davison M. 2001. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. Proteomics 1: 377-396.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A 76: 4350-4354.
- Traynor TR, Huffnagle GB. 2001. Role of chemokines in fungal infections. Med Mycol 39: 41-50.
- Turjanski AG, Vaque JP, Gutkind JS. 2007. MAP kinases and the control of nuclear events. Oncogene 26: 3240-3253.
- Unlü M, Morgan ME, Minden JS. 1997. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. Electrophoresis. 18: 2071-7.
- Urban C, Sohn K, Lottspeich F, Brunner H, Rupp S. 2003. Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell. FEBS Lett 544: 228-235.

- van Burik JA, Magee PT. 2001. Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu Rev Microbiol* 55: 743-772.
- van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, van der Meer JW, Gow NA, Netea MG. 2008. Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol* 11: 305-312.
- Van de Velde S, Thevelein JM. 2008. Cyclic AMP-protein kinase A and Snf1 signaling mechanisms underlie the superior potency of sucrose for induction of filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 7: 286-293.
- Vautier S, Sousa Mda G, Brown GD. 2010. C-type lectins, fungi and Th17 responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 21: 405-412.
- Vidon N, Huchet B, Rambaud JC. 1986. Influence of *Saccharomyces boulardii* on jejunal secretion in rats induced by cholera toxin. *Gastroenterol Clin Biol* 10: 13-16.
- Vonk AG, De Bont N, Netea MG, Demacker PN, van der Meer JW, Stalenhoef AF, Kullberg BJ. 2004. Apolipoprotein-E-deficient mice exhibit an increased susceptibility to disseminated candidiasis. *Med Mycol* 42: 341-348.
- Walport MJ. 2001. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*. 344:1058-66.
- Wang JE, Warris A, Ellingsen EA, Jorgensen PF, Flo TH, Espevik T, Solberg R, Verweij PE, Aasen AO. 2001. Involvement of CD14 and toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect Immun* 69: 2402-2406.
- Warena AJ, Kauffman S, Sherrill TP, Becker JM, Konopka JB. 2003. *Candida albicans* septin mutants are defective for invasive growth and virulence. *Infect Immun* 71: 4045-4051.
- Weger SD, Ganji A, Clemons KV, Byron JK, Minn Y, Stevens DA. 2002. Correlation of the frequency of petite formation by isolates of *Saccharomyces cerevisiae* with virulence. *Med Mycol* 40: 161-168.
- Wheeler RT, Kupiec M, Magnelli P, Abeijon C, Fink GR. 2003. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant with increased virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2766-2770.
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79: 143-180.
- Wilson RA, Curwen RS, Braschi S, Hall SL, Coulson PS, Ashton PD. 2004. From genomes to vaccines via the proteome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 45-50.
- Wilson WA, Hawley SA, Hardie DG. 1996. Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr Biol* 6: 1426-1434.
- Wittig I, Schagger H. 2008. Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics* 8: 3974-3990.
- Woods JP. 2003. Knocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma capsulatum* intracellular pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 6: 327-331.
- Xie X, Lipke PN. 2010. On the evolution of fungal and yeast cell walls. *Yeast* 27: 479-488.
- Yáñez A, Murciano C, Llopis S, Fernández-Espinar T, Gil ML, Gozalbo D. 2009. *In Vivo* and *In Vitro* Studies on Virulence and Host Responses to *Saccharomyces cerevisiae* Clinical and Non-Clinical Isolates. *The Open Mycology Journal*. 3: 37-47.
- Yin QY, de Groot PW, Dekker HL, de Jong L, Klis FM, de Koster CG. 2005. Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *J Biol Chem* 280: 20894-20901.
- Yoda K, Kawada T, Kaibara C, Fujie A, Abe M, Hitoshi, Hashimoto, Shimizu J, Tomishige N, Noda Y, Yamasaki M. 2000. Defect in cell wall integrity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* caused by a mutation of the GDP-mannose pyrophosphorylase gene *VIG9*. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 1937-1941.
- Zaragoza O, Gancedo JM. 2000. Pseudohyphal growth is induced in *Saccharomyces cerevisiae* by a combination of stress and cAMP signalling. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78: 187-194.

- Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. 2009. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol* 68: 133-216.
- Zbinden R, Bonczi E, Altwegg M. 1999. Inhibition of *Saccharomyces boulardii* (nom. inval.) on cell invasion of *Salmonella typhimurium* and *Yersinia enterocolitica*. *Microb Ecol Health Dis.* 11: 158-162.
- Zelante T, De Luca A, Bonifazi P, Montagnoli C, Bozza S, Moretti S, Belladonna ML, Vacca C, Conte C, Mosci P, Bistoni F, Puccetti P, Kastelein RA, Kopf M, Romani L. 2007. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol* 37: 2695-2706.
- Zeller CE, Parnell SC, Dohlman HG. 2007. The RACK1 ortholog Asc1 functions as a G-protein beta subunit coupled to glucose responsiveness in yeast. *J Biol Chem* 282: 25168-25176.
- Zerva L, Hollis RJ, Pfaller MA. 1996. In vitro susceptibility testing and DNA typing of *Saccharomyces cerevisiae* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 34: 3031-3034.
- Zhang J, Zhu J, Imrich A, Cushion M, Kinane TB, Koziel H. 2004a. Pneumocystis activates human alveolar macrophage NF-kappaB signaling through mannose receptors. *Infect Immun* 72: 3147-3160.
- Zhang X, Lester RL, Dickson RC. 2004b. Pil1p and Lsp1p negatively regulate the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-like kinase Pkh1p and downstream signaling pathways Pkc1p and Ypk1p. *J Biol Chem* 279: 22030-22038.
- Zipfel PF, Skerka C. 2009. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* 9: 729-740.
- Zupan J, Raspor P. 2010. Invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae* depends on environmental triggers: a quantitative model. *Yeast* 27: 217-228.



ANEXOS

Anexo I.

Tabla 1. Proteínas de *S. cerevisiae* identificadas en el estudio de la respuesta serológica a la infección sistémica por *S. cerevisiae* mediante inmunoproteómica.

Nombre	Código de acceso ^a	PM ^c	pI ^c	Péptidos coincidentes / Péptidos totales ^c	Cobertura ^c	Score ^c
Act1 ^d	ACT_YEAST	41891	5.44	9/69	21	181
				R.AVFPSIVGRPR.H(53)		
				R.VAPEEHPVLLTEAPMNP.K.S(16)		
				K.SYELPDGQVITIGNER.F(81)		
Adh1 ¹	ADH1_YEAST	37282	6.21	20/65	58	184
Adh1 ²				20/65	58	183
Adh1 ³				10/65	31	74
Adh1 ⁴				7/32	28	66
Adh1 ⁵				9/65	32	64
Ahp1	AHP1_YEAST	19274	5.01	13/65	71	129
Atp1 ¹	ATPA_YEAST	58629	9.06	16/65	32	117
Atp1 ²				29/65	46	296
Bfr1	BFR1_YEAST	54606	9.18	16/60	34	130
Cdc19 ¹	KPYK1_YEAST	54909	7.56	17/65	48	154
Cdc19 ²				17/65	35	132
Dbp2	DBP2_YEAST	61233	8.8	21/65	26	146
Egd2	NACA_YEAST	18698	4.84	9/65	52	90
Eno1	ENO1_YEAST	46830	6.16	28/65	67	276
Eno2 ¹	ENO2_YEAST	46942	5.67	32/65	69	305
Eno2 ²				20/65	52	170
Eno2 ³				31/65	68	285
Eno2 ⁴				15/65	40	116
Eno2 ⁵				6/8	19	91
Fba1	ALF_YEAST	39881	5.51	18/37	47	224
Gcd11	IF2G_YEAST	58400	6.37	25/65	47	220
Gln1	GLNA_YEAST	42138	5.92	19/65	29	124
Hsp60 ¹	HSP60_YEAST	60999	5.23	18/65	42	157
Hsp60 ²				21/65	37	186
Idh1	IDH1_YEAST	39300	8.99	21/65	61	213
Ilv5	ILV5_YEAST	44512	9.1	30/57	67	310
Imd2	IMDH2_YEAST	56950	8.71	12/36	32	114
Kes1	KES1_YEAST	49632	5.73	11/27	26	110
Npl3+Ald6 ^b	NOP3_YEAST + ALDH6_YEAST			20/65		91
	NOP3_YEAST	45437	5.38	10/65	24	
	ALDH6_YEAST	54779	5.31	10/65	18	
Oye2	OYE2_YEAST	44983	6.13	23/65	49	216
Lat1 ^d	ODP2_YEAST	51957	7.6	15/70	26	157
				K.GISLKDVGHTGPR.G(59)		
				K.RVPDANAYWLPNENVIR.K(28)		
Pdc1 ¹	PDC1_YEAST	61685	5.8	20/65	35	128
Pdc1 ²				33/65	63	311

Tabla 1. Continuación.

Nombre	Código de acceso ^a	PM ^c	pI ^c	Péptidos coincidentes / Péptidos totales ^c	Cobertura ^c	Score ^c
Pdc1 ^{3d}				16/68	32	160
				R.WAGNANELNAAYAADGYAR.I(16)		
				R.YGGVYVGTLSKPEVK.E(30)		
				K.GYKPVAVPAR.T(38)		
Pep4	CARP_YEAST	44699	4.7	10/65	19	69
Pgk1 ¹	PGK_YEAST	44768	7.11	27/65	73	314
Pgk1 ²				25/65	65	277
Pgk1 ³				16/60	43	136
Pgk1 ^{4d}				12/70	19	153
				K.YVLEHHPR.Y(29)		
				R.YHIEEGSR.K(55)		
				R.AHSSMVGFDPQR.A(22)		
				R.AHSSMVGFDPQR.A(30)		
Pgk1+Cit1 ^b	PGK_YEAST + CYS1_YEAST			41/65		372
	PGK_YEAST	44768	7.11	24/65	63	
	CYS1_YEAST	53384	8.23	17/65	30	
Pgk1+Arc1 ^b	PGK_YEAST + G4P1_YEAST			26/65		145
	PGK_YEAST	44768	7.11	14/65	37	
	G4P1_YEAST	42229	7.69	13/65	38	
Prb1 ^d	PRTB_YEAST	69807	5.94	10/67	11	202
				R.LNLGSFNKYLYDDAGR.G(111)		
				K.YLYDDAGR.G(57)		
Rpl5	RL5_YEAST	33779	6.36	15/65	54	149
Rpp0 ¹	RLA0_YEAST	33745	4.75	19/65	43	171
Rpp0 ²				10/65	30	80
Sbp1 ^d	SSBP1_YEAST	33026	5.48	8/71	17	55
				K.IDFDNIKENYDTK.V(13)		
				R.EKIPLDQMER.S(22)		
Shm1 ¹	GLYM_YEAST	53881	8.83	12/65	22	68
Shm1 ²				12/28	26	117
Shm1 ³				7/17	14	71
Shm2 ¹	GLYC_YEAST	52471	6.98	11/23	20	121
Shm2 ²				10/15	20	129
Ssa1 ¹	HSP71_YEAST	69786	5	24/65	40	213
Ssa1 ²				28/65	47	265
Ssa2	HSP72_YEAST	69599	4.95	26/65	43	248
Ssa2+Hsp90 ^b	HSP72_YEAST + HSC82_YEAST			41/65		302
	HSP72_YEAST	69599	4.95	23/65	42	
	HSC82_YEAST	80850	4.78	19/65	32	
Ssb1 ¹	HSP75_YEAST	66732	5.32	28/65	52	278
Ssb1 ²				28/65	53	282
Ssb1 ³				22/65	42	201
Ssc1+Tif3 ^b	HSP77_YEAST + IF4B_YEAST			26/65		133
	HSP77_YEAST	70585	5.48	15/65	27	
	IF4B_YEAST	48493	5.17	11/65	29	
Ssc1 ¹	HSP77_YEAST	70585	5.48	12/65	24	70
Ssc1 ²				21/65	37	169
Sse1 ¹	HSP7F_YEAST	77604	5.12	31/65	46	303
Sse1 ²				32/65	50	321
Sse1 ³				16/65	27	112

Tabla 1. Continuación.

Nombre	Código de acceso ^a	PM ^c	pI ^c	Péptidos coincidentes / Péptidos totales ^c	Cobertura ^c	Score ^c
Ssz1	SSZ1_YEAST	58316	4.94	10/65	30	64
Stm1	STM1_YEAST	29977	9.66	14/65	52	144
Tdh1 ¹	G3P1_YEAST	35842	8.29	19/65	61	148
Tdh1 ²				11/60	48	96
Tdh1 ^{3 d}				12/68	42	168
				K.IVSNASCTTNCLAPLAK.V(19)		
				K.TVDGPSHKDWR.G(34)		
				K.LISWYDNEYGYSTR.V(49)		
Tdh1+Gcy1 ^b	G3P1_YEAST + GCY_YEAST			28/65		242
	G3P1_YEAST	35842	8.29	15/65	62	
	GCY_YEAST	35171	7.75	13/65	53	
Tdh1+Tef1 ^b	G3P1_YEAST + EF1A_YEAST			31/65		229
	G3P1_YEAST	35842	8.29	19/65	71	
	EF1A_YEAST	50400	9.14	12/65	34	
Tdh2 ¹	G3P2_YEAST	35938	6.46	9/34	32	93
Tdh2 ^{2 d}				11/68	37	172
				K.TVDGPSHKDWR.G(37)		
				K.LVSWYDNEYGYSTR.V(77)		
Tdh2 ^{3 d}				8/67	27	177
				K.TVDGPSHKDWR.G(55)		
				K.LVSWYDNEYGYSTR.V(86)		
Tdh2+Pgk1 ^b	G3P2_YEAST + PGK_YEAST			19/65		95
	G3P2_YEAST	35938	6.46	9/65	33	
	PGK_YEAST	44768	7.11	10/65	32	
Tdh3 ¹	G3P3_YEAST	35838	6.46	21/65	82	208
Tdh3 ²				14/65	59	115
Tdh3 ³				13/65	56	113
Tdh3 ⁴				16/65	67	147
Tdh3 ⁵				14/65	62	140
Tdh3 ⁶				9/34	31	80
Tdh3 ⁷				11/65	50	80
Tdh3 ⁸				16/65	68	146
Tdh3 ⁹				22/65	82	221
Tdh3 ¹⁰				7/30	25	73
Tdh3 ¹¹				19/65	73	175
Tdh3 ^{12 d}				10/68	31	175
				K.TVDGPSHKDWR.G(52)		
				K.LVSWYDNEYGYSTR.V(69)		
Tdh3 ^{13 d}				10/68	31	164
				K.TVDGPSHKDWR.G(23)		
				K.LVSWYDNEYGYSTR.V(89)		
Tdh3 ^{14 d}				11/68	37	183
				K.TVDGPSHKDWR.G(41)		
				K.LVSWYDNEYGYSTR.V(86)		
Tef1 ¹	EF1A_YEAST	50400	9.14	8/22	19	78
Tef1 ²				13/65	34	81
Tef1 ³				10/22	26	106
Tef1 ⁴				17/49	43	155
Yhb1 ¹	FHP_YEAST	44846	5.86	26/65	62	241
Yhb1 ²				21/65	49	174

Tabla 1. Continuación.

Nombre	Código de acceso ^a	PM ^c	pI ^c	Péptidos coincidentes / Péptidos totales ^c	Cobertura ^c	Score ^c
YNL134C+Pdc1 ^b	YNN4_YEAST + PDC1_YEAST			29/65		202
	YNN4_YEAST	41367	5.82	17/65	58	
	PDC1_YEAST	61685	5.8	12/65	29	

^a código de acceso de la base de datos Swiss Prot 57,15; ^b manchas proteicas identificadas como una mezcla de proteínas; ^c peso molecular (Da), punto isoelectrico, péptidos coincidentes respecto a péptidos totales, cobertura (porcentaje de la secuencia proteica que cubren los péptidos coincidentes) y score (medida de la significación estadística de la identificación) derivados de los resultados de la página Mascot (MatrixScience; <http://www.matrixscience.com>); ^d manchas de proteína identificadas por huella peptídica en combinación con análisis de fragmentación de péptidos, las secuencias de los iones que fueron identificados por MALDI-TOF/TOF se muestran en la columna de péptidos coincidentes / péptidos totales y el store de los péptidos fragmentados se muestran entre corchetes; ¹⁻¹⁴ corresponden a las diferentes manchas proteicas de la misma proteína.

Tabla 2. Proteínas de *C. albicans* identificadas en el estudio de la respuesta serológica a la infección sistémica por *S. cerevisiae* mediante inmunoproteómica.

Nombre	Código de acceso ^a	PM ^c	pI ^c	Péptidos coincidentes / Péptidos totales ^c	Cobertura ^c	Score ^c
Bmh1	orf19.3014	29576	4.75	18/65	56	169
Eno1	orf19.395	47202	5.54	18/65	55	181
Hsp60	orf19.717	60374	5.22	34/65	53	327
Pab1	orf19.3037	70659	5.21	18/65	31	104
Pdc11	orf19.2877	62744	5.39	28/65	54	283
Pdc11+Hts1 ^b	orf19.2877 + orf19.4051					140
	orf19.2877	62744	5.39	13/65	32	
	orf19.4051	55839	5.96	14/65	37	
Pdc11+Ytm1 ^b	orf19.2877 + orf19.4815					193
	orf19.2877	62744	5.39	20/65	47	
	orf19.4815	51772	5.66	11/65	31	
Ssb1+Ssc1 ^b	orf19.6367 + orf19.1896					281
	orf19.6367	66580	5.25	20/65	45	
	orf19.1896	69876	5.48	18/65	32	
Ses1	orf19.269	53040	5.85	21/65	52	182
Tdh3	orf19.6814	35925	6.61	16/65	62	128

^a código de acceso de la base de datos Swiss CGD21. ^b manchas proteicas identificadas como una mezcla de proteínas. ^c peso molecular (Da), punto isoelectrico, péptidos coincidentes respecto a péptidos totales, cobertura (porcentaje de la secuencia proteica que cubren los péptidos coincidentes) y score (medida de la significación estadística de la identificación) derivados de los resultados de la página Mascot (MatrixScience; <http://www.matrixscience.com>).

Tabla 3. Proteínas de *S. cerevisiae* identificadas en el estudio 2D-DIGE.

Nombre	Código acceso ^a	de ^a	PM ^b	pI ^b	Péptidos coincidentes/ Péptidos totales ^b	Cobertura ^b	Score ^b
Ach1	YBL015W		58903	6.3	28/57	43	238
Act1	YFL039C		41891	5.44	13/65	36	81
Ade1	YAR015W		34639	5.66	10/58	47	85
Adh1 ¹	YOL086C		37282	6.21	17/65	49	163
Adh1 ²					11/65	37	89
Adh1 ^{3e}					7/10	16	254
					R.VLGIDGGEGKEELFR.S (87)		
					K.SISIVGSYVGNR.A (70)		
					R.EALDFFAR.G (39)		
Adh1 ⁴					25/65	61	231
Adh1 ⁵					21/65	53	208
Adh1 ^{6e}					2/23	4	73
					R.VLGIDGGEGKEELFR.S (67)		
Adh1 ⁷					13/65	36	81
Adk1 ^e	YDR226W		24297	5.98	4/68	23	59
					K.AIELKVDELLVAR.I (44)		
Ahp1	YLR109W		19274	5.01	11/63	73	106
Asc1 ^{1e}	YMR116C		34898	5.8	8/67	20	106
					R.LWDVATGETYQR.F (71)		
Asc1 ²					11/65	46	85
Asc1 ^{3e}					6/42	16	134
					R.LWDVATGETYQR.F (61)		
					K.DGEIMLWNLA.K (47)		
Atp1	YBL099W		58639	9.06	8/31	20	65
Atp3 ^e	YBR039W		34443	9.34	9/68	24	145
					R.HLNDQPNADIVTIGDK.I (45)		
					R.HLNDQPNADIVTIGDK.IK.M (50)		
					R.YSILYNR.T (17)		
Bfr1	YOR198C		54606	9.18	18/65	35	131
Bmh1 ^d	YER177W		31099	4.65	MS/MS ^d	5	42
					R.YLAEFSSGDAR.E (42)		
Car1 ^e	YPL111W		35981	5.38	11/68	24	143
					K.NRELSIVLAPFSGGQK.L (39)		
					R.ELSIVLAPFSGGQK.L (44)		
Cdc10 ^e	YCR002C		37059	5.5	8/67	34	82
					R.LNINVIDTPGFGDFIDNSK.A (38)		
Cdc19 ¹	YAL038W		54909	7.56	15/65	27	93
Cdc19 ^{2e}					25/69	48	272
					K.TNNPETLVALR.K (37)		
					R.GDLGIEIPAPEVLAVQK.K (39)		
Cdc19 ^{3e}					10/70	18	144
					R.GDLGIEIPAPEVLAVQK.L (73)		
					K.AIVLSTSGTTPR.L (23)		
					K.YRPNCPIILVTR.C (12)		

Tabla 3. Continuación

Nombre	Código acceso ^a	de	PM ^b	pl ^b	Péptidos coincidentes/ Péptidos totales ^b	Cobertura ^b	Score ^b
Cdc19 ^{4e}					10/70 R.GDLGIEIPAPEVLAVQKK.L (73) K.AIVLSTSGTTPR.L (23) K.YRPNCPIILVTR.C (12)	18	144
Cdc19+Tdh1	YAL038W + YJL052W				16/30		158
	YAL038W	54909	7.56	10/30		27	
	YJL052W	35842	8.29	6/30		25	
Cit1	YNR001C	53384	8.23	11/47		25	76
Cys3	YAL012W	42516	6.06	13/30		49	145
Cys4 ¹	YGR155W	56044	6.25	25/65		50	239
Cys4 ²				23/65		44	208
Dld3	YEL071W	55532	6.41	8/35		21	59
Dug1	YFR044C	53123	5.43	10/47		24	79
Eft1 ^e	YOR133W	93686	5.92	12/68 R.GQVVSEEQRPGLFTVK.A (37) K.AYLPVNESFGFTGELR.Q (46)		15	117
Egd1 ^e	YPL037C	17010	6.10	7/68 M.PIDQEKLAK.L (63) K.KDEAIPELVGQTFDADVE.- (92)		43	197
Eno1 ¹	YGR254W	46844	6.16	12/65		29	76
Eno1 ²				17/65		44	130
Eno1 ^{3e}				13/69 R.SIVPSGASTGVHEALEMR.D (8) K.NVNDVIAPAFVK.A (42)		28	113
Eno1 ⁴				12/33		33	117
Eno1 ⁵				11/29		38	121
Eno1 ⁶				21/65		53	180
Eno1 ⁷				34/65		72	379
Eno1 ⁸				8/21		24	76
Eno2 ¹	YHR174W	46942	5.67	14/65		36	92
Eno2 ²				16/65		48	117
Eno2 ³				15/65		36	103
Eno2 ^{4e}				8/67 K.IGLDCASSEFFK.D (49) K.TAGIQIVADDLTVNPAR.I (83) R.SGETEDTFIADLVGLR.T (99)		16	253
Eno2 ⁵				21/65		52	169
Eno2 ⁶				19/65		35	141
Eno2 ⁷				13/65		42	92
Eno2 ⁸				12/65		40	95
Eno2 ⁹				5/46 R.VLGIDGGEGKEELFR.S (49)		20	76
Eno2 ¹⁰				24/65		61	220
Eno2 ¹¹				10/65		30	68
Eno2 ¹²				16/65		41	119
Eno2+Act1	YHR174W + YFL039C			25/62			170
	YHR174W	46942	5.67	14/62		42	
	YFL039C	41891	5.44	12/62		38	

Tabla 3. Continuación

Nombre	Código de acceso ^a	de	PM ^b	pI ^b	Péptidos coincidentes/ Péptidos totales ^b	Cobertura ^b	Score ^b
Erg13 ^e	YML126C		55435	8.36	7/36	9	162
					K.YFDYNVFHVPTCK.L (40)		
					R.LLYNDFR.A (22)		
					R.ANPQLFPEVDAELATR.D (79)		
Fba1	YKL060C		39881	5.51	19/65	56	190
Gdh1	YOR375C		49881	5.56	23/65	57	189
Gpm1	YKL152C		27592	8.81	13/70	36	134
					R.SFDVPPPPIDASSPFSQK.G (69)		
Grs1 ^e	YBR121C		75706	5.71	3/5	4	90
					K.GYLRPETAQQQFLNFK.L (18)		
					R.EYVPSVIEPSFGIGR.I (49)		
Hsp26	YBR072W		23865	5.31	12/65	67	125
Hxk2+Hxk1	YGL253W + YFR053C				35/65		265
	YGL253W		54136	5.16	23/65	45	
	YFR053C		53933	5.28	13/65	30	
Hyp2 ^e	YEL034W				5/66	19	165
					K.VHLVAIDFTGK.K (105)		
					K.KLEDLSPSTHNMEVPVVK.R (49)		
Ilv2 ^e	YMR108W		75061	8.59	11/50	18	171
					K.TTLPSNALNQLTSR.A (29)		
					K.KPVLVYGAGILNHADGPR.L (28)		
					R.YSHTHQLNPDIK.L (69)		
Ilv5	YLR355C		44512	9.1	23/65	53	202
Imd2 ^d	YHR216W		56950	8.71	MS/MS ^d	2	44
					R.EQAANLIAAGADGLR.I (44)		
Imd3	YLR432W		56948	7.04	13/54	33	92
Mae1	YKL029C		74843	8.39	21/65	36	158
Mdh1	YKL085W		35685	8.46	14/72	29	235
					K.GVATDLSHIPTNSVVK.G (5)		
					R.DDLFAINASIVR.D (30)		
					K.KLFGVTTLDSIR.A (2)		
					R.FISEVENTDPTQER.V (69)		
					K.FANAVLSGFKGER.D (11)		
					R.DVIEPSFVDSPLFK.S (67)		
Msc1	YML128C		59552	7.06	16/65	33	96
Npl3	YDR432W		45437	5.38	10/63	25	69
Om45 ^{1e}	YIL136W		44553	8.55	6/31	15	70
					R.DFNELSDKLDQQR.N (30)		
Om45 ²					11/65	33	79
Oye2	YHR179W		44983	6.13	26/65	59	277
Oye3	YPL171C		45006	5.4	10/65	37	73
Pdc1 ¹	YLR044C		61685	5.80	9/33	25	78
Pdc1 ^{2e}					11/68	12	125
					K.NIVEFHSDHMK.I (28)		
					R.VATTGEWDKLTQDK.S (68)		
Pdc1 ³					24/62	41	160

Tabla 3. Continuación

Nombre	Código de acceso ^a	de	PM ^b	pI ^b	Péptidos coincidentes/ Péptidos totales ^b	Cobertura ^b	Score ^b
Pdc1 ⁴					11/70 R.YGGVYVGTLSKPEVK.E (61)	15	103
Pdc1+Eno1	YLR044C + YGR254W				32/65		216
	YLR044C	61685	5.80	21/65		36	
	YGR254W	46844	6.16	12/65		34	
Pet10 ^e	YKR046C	31227	7.79	11/69		30	255
					R.EFLIKPLHLQGSTASK.E (44)		
					K.VTDASSLPVHVAELSSTTR.G (86)		
					R.FTTVYENNLSKSESVPK.A (40)		
Pgk1 ¹	YCR012W	44768	7.11	11/47		33	82
Pgk1 ²				12/38		39	122
Pgk1 ³				23/65		53	230
Pgk1 ⁴				23/65		53	230
Pgk1 ⁵				8/65		36	57
Pgk1 ⁶				33/65		79	403
Pgk1+Cit1	YCR012W + YNR001C			44/65			456
	YCR012W	44768	7.11	29/65		70	
	YNR001C	53384	8.23	15/65		29	
Pgm2	YMR105C	63391	6.18	15/41		27	125
Pil1	YGR086C	38326	4.54	13/57		43	123
Por1 ¹	YNL055C	30524	7.7	19/65		69	174
Por1 ^{2e}				8/37		22	202
					K.SAVLNTTFTQPFFTAR.G (70)		
					K.LPNSNVNIEFATR.Y (70)		
					K.QLLRPGVTLGVGSSFDALK.L (18)		
Por1 ³				22/65		75	227
Por1 ^{4e}				6/67		17	104
					M.SPPVYSDISR.N (54)		
					K.SAVLNTTFTQPFFTAR.G (30)		
Por1 ^{5e}				6/64		13	140
					M.SPPVYSDISR.N (40)		
					K.SAVLNTTFTQPFFTAR.G (52)		
					K.LPNSNVNIEFATR.Y (34)		
Pro2 ^e	YOR323C	49881	5.37	13/71		32	154
					K.IVNDTIAQFQSETGVPVGSVQLIETR.Q (29)		
					K.FVTSTESAIQHINTHSSR.H (28)		
					K.GVDSSGVYWNASTR.F (33)		
Pst2	YDR032C	21010	5.46	10/65		76	96
Qcr2 ^e	YPR191W	40510	7.67	10/69		21	93
					K.LDKFTDGGGLFTLFVR.D (40)		
Rhr2	YIL053W	28100	5.35	13/65		45	126
Rps5	YJR123W	25080	8.63	8/24		36	95
Sdh1 ^e	YKL148C	70812	7.14	13/69		17	191
					K.GSDWLGDQDSIHYMTR.E (9)		
					K.SIIELEHYGVFSTR.T (52)		
					K.TIIATGGYGR.A (41)		
					R.GEGGFLVNSEGER.F (54)		

Tabla 3. Continuación

Nombre	Código acceso ^a	de	PM ^b	pI ^b	Péptidos coincidentes/ Péptidos totales ^b	Cobertura ^b	Score ^b
Shm2 ¹	YLR058C		52471	6.98	19/65	40	129
Shm2 ²					8/65	9	90
					K.ALESEFKNLGYR.L (34)		
					R.GMGEEDFHR.I (18)		
					K.AVEFAQQVQQSLPK.D (28)		
Sod1	YJR104C		15959	5.62	4/21	47	54
Sod2 ^e	YHR008C		25815	8.49	8/40	21	177
					K.AIDEQFGSLDELIK.L (100)		
					K.AIDEQFGSLDELIKLTNTK.L (23)		
Ssa1 ^{1d}	YNR001C		69786	5.00	MS/MS ^d	4	64
					K.VNDAVVTVPAYFNDSQR.Q (58)		
					R.ARFEELCADLFR.S (6)		
Ssa1 ^{2e}					3/67	4	95
					K.VNDAVVTVPAYFNDSQR.Q (95)		
Ssa1 ^{3e}					9/32	9	92
					K.ATAGDTHLGGEDFDNR.L (41)		
					K.LDKSQVDEIVLVGGSTR.I (19)		
Ssa1 ^{4e}					9/63	12	107
					K.VNDAVVTVPAYFNDSQR.Q (28)		
					K.ATAGDTHLGGEDFDNR.L (52)		
					R.ARFEELCADLFR.S (3)		
Ssb1 ¹	YNL209W		66668	5.37	2/11	3	78
					K.AVITVPAYFNDAQR.Q (64)		
Ssb1 ²					20/65	42	171
Ssb1 ^{3d}					MS/MS ^d	2	27
					K.AVITVPAYFNDAQR.Q (27)		
Ssc1	YJR045C		70585	5.48	30/65	42	267
Tdh1 ¹	YJL052W		35842	8.29	15/65	52	119
Tdh1 ²					12/48	43	117
Tdh2 ^e	YJR009C		35938	6.46	7/66	18	104
					K.LVSWYDNEYGYSTR.V (73)		
Tdh3 ^{1e}	YGR192C		35838	6.46	10/68	28	198
					K.TVDGPSHKDWR.G (57)		
					K.LVSWYDNEYGYSTR.V (95)		
Tdh3 ²					18/65	65	169
Tdh3 ³					10/65	39	80
Tdh3 ^{4e}					8/43	21	111
					K.TVDGPSHKDWR.G (10)		
					K.LVSWYDNEYGYSTR.V (64)		
Tdh3 ^{5e}					8/59	31	131
					R.YAGEVSHDDKHIIVDGGK.K (49)		
					K.LVSWYDNEYGYSTR.V (41)		
Tdh3 ⁶					16/65	68	138
Tdh3 ⁷					12/65	48	91
Tdh3 ⁸					12/65	44	80
Tdh3 ⁹					12/65	40	101

Tabla 3. Continuación

Nombre	Código acceso ^a	de	PM ^b	pI ^b	Péptidos coincidentes/ Péptidos totales ^b	Cobertura ^b	Score ^b
Tdh3 ^{10 e}					7/69	17	194
					K.IVSNASCTTNCLAPLAK.V (59)		
					K.TVDGPSHKDWR.G (51)		
					K.LVSWYDNEYGYSTR.V (65)		
Tdh3 ¹¹					20/65	81	174
Tdh3 ^{12 e}					5/66	21	73
					K.LVSWYDNEYGYSTR.V (51)		
Tdh3 ¹³					23/65	58	220
Tdh3 ¹⁴					8/45	23	149
					R.YAGEVSHDDKHIIVDGK.K (75)		
					K.TVDGPSHKDWR.G (38)		
Tdh3 ¹⁵					4/70	10	80
					K.LVSWYDNEYGYSTR.V (69)		
Tef1 ^{1 e}	YPR080W	50400	9.14	6/30		12	112
					K.YQVTVIDAPGHR.D (44)		
					R.EHALLAFTLGVR.Q (42)		
Tef1 ²				19/64		44	139
Tef2 ¹	YBR118W	50400	9.14	21/65		49	164
Tef2 ²				10/65		27	57
Tef4+Pgk1 ^c	YKL081W + YCR012W			22/54			165
	YKL081W	46605	7.63	14/54		34	
	YCR012W	44768	7.11	8/54		22	
Tif3	YPR163C	48493	5.17	19/61		40	169
Tma20 ^d	YER007C-A	20379	6.54	MS/MS ^d		8	44
					K.LVHKFPEAYPTVQVDR.G (44)		
Tpi1 ¹	YDR050C	26893	5.74	14/65		60	146
Tpi1 ²				11/65		41	99
Wtm1 ^e	YOR230W	48467	5.18	16/70		33	421
					K.SSTPSTYEHISLRPK.F (72)		
					K.IIDNAGKPGEILR.T (92)		
					R.TVHVPGTTVTHTVR.F (72)		
					R.TSDKPIWVLGEPK.N (53)		
					R.AAEAATDTLYR.Q (51)		
Yhb1	YGR234W	44846	5.86	23/65		61	196
YNL134C ¹	YNL134C	41367	5.82	18/65		59	182
YNL134C ^{2 e}				11/68		38	190
					K.TVAVAGNPTDWK.H (40)		
					K.IGPQGALLGCDAAGQIVK.L (65)		
					K.CAADDLDATVVQLTVLTEK.D (26)		
Zuo1	YGR285C	49047	8.18	9/65		25	56

^a código de acceso de la base de datos SGD 09; ^b peso molecular (Da), punto isoelectrico, péptidos coincidentes respecto a péptidos totales, cobertura (porcentaje de la secuencia proteica que cubren los péptidos coincidentes) y score (medida de la significación estadística de la identificación) derivados de los resultados de la página Mascot (MatrixScience; <http://www.matrixscience.com>); ^c manchas proteicas identificadas como una mezcla de proteínas; ^d proteína identificada por espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF/TOF, las secuencias de los iones que fueron identificados por MALDI-TOF/TOF se muestran en la columna de péptidos coincidentes / péptidos totales y el store de los péptidos fragmentados se muestran entre corchetes; ^e manchas de proteína identificadas por huella peptídica en combinación con análisis de fragmentación de péptidos, las secuencias de los iones que fueron identificados por MALDI-

TOF/TOF se muestran en la columna de péptidos coincidentes / péptidos totales y el store de los péptidos fragmentados se muestran entre corchetes; ¹⁻¹⁴ corresponden a las diferentes especies proteicas de la misma proteína.

Tabla 4. Proteínas humanas identificadas en el estudio 2D-DIGE.

Nombre	Código de acceso ^a	PM ^b	pI ^b	Péptidos coincidentes/ Péptidos totales ^b	Cobertura ^b	Score ^b
C3 ^{1c}	sp P01024 CO3_HUMAN	188569	6.02	33/71	17	514
				K.TIYTPGSTVLYR.I (44)		
				R.IPIEDGSGEVLSR.K (118)		
				R.KVLLDGVQNPR.A (70)		
				R.SGIPIVTSPYQIHFTK.T (71)		
				R.TELRPGETLNVNLLR.M (15)		
				R.LVAYYTLIGASGQR.E (57)		
C3 ^{2c}				7/69	3	64
				K.TIYTPGSTVLYR.I (22)		
				R.IPIEDGSGEVLSR.K (42)		
C3 ³				39/65	25	258
C3 ^{4c}				12/27	9	76
				R.IPIEDGSGEVLSR.K (43)		
C3 ^{5c}				14/69	8	174
				K.TIYTPGSTVLYR.I (24)		
				K.VEGTAFVIFGIQDGEQR.I (22)		
				R.IPIEDGSGEVLSR.K (60)		
				R.KVLLDGVQNPR.A (44)		
C3 ^{6c}				22/69	12	231
				K.VTIKPAPETEKRPQDAK.N (33)		
				K.NTMILEICTR.Y Oxidation (M) (12)		
				K.VYAYYNLEESCTR.F (72)		
				K.SGSDEVQVGQQR.T (71)		
CFB	sp P00751 CFAB_HUMAN	86847	6.67	31/103	37	187
CFP ^{1c}	sp P27918 PROP_HUMAN	53751	8.32	15/72	29	203
				R.KCSAPEPSQKPPGKPCPLAYEQR.R (15)		
				R.TCNHPVPQHGGPFCAGDATR.T (65)		
				K.SISCQEIPGQQR.G (43)		
CFP ^{2c}				14/68	31	116
				K.SISCQEIPGQQR.G (26)		
FGB ^c	sp P02675 FIBB_HUMAN	56577	8.54	10/69	15	176
				K.HQLYIDETVNSNIPTNLR.V (75)		
				K.EDGGGWYNR.C (31)		
				K.HGTDDGVVWMNWK.G (20)		
				K.IRPFFPQQ.- (23)		
IGHG1 ^d	sp P01857 IGHG1_HUMAN	36596	8.46	MS/MS ^d	5	49
				K.TTPVLDSGDSFFLYSK.L (49)		

^a código de acceso de la base de datos UniProtKB-SwissProt sprot_160909; ^b peso molecular (Da), punto isoelectrico, péptidos coincidentes respecto a péptidos totales, cobertura (porcentaje de la secuencia proteica que cubren los péptidos coincidentes) y score (medida de la significación estadística de la identificación) derivados de los resultados de la página Mascot (MatrixScience; <http://www.matrixscience.com>); ^c proteína identificada por espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF/TOF, las secuencias de los iones que fueron identificados por MALDI-TOF/TOF se muestran en la columna de péptidos coincidentes / péptidos totales y el store de los péptidos fragmentados se muestran

entre corchetes; ^d manchas de proteína identificadas por huella peptídica en combinación con análisis de fragmentación de péptidos, las secuencias de los iones que fueron identificados por MALDI-TOF/TOF se muestran en la columna de péptidos coincidentes / péptidos totales y el store de los péptidos fragmentados se muestran entre corchetes; ¹⁻⁶ corresponden a las diferentes especies proteicas de la misma proteína.

Anexo II.

Tabla 1. Proteínas de *S. cerevisiae* que aumentan o disminuyen su abundancia con los valores de ratio y T-test en las comparaciones: D14 t=0 frente W303 t=0; D14 t=1.5h frente W303 t=1.5h; D14 t=3h frente W303 t=3h.

Comparación			D14-0/W303-0		D14-1.5/W303-1.5		D14-3/W303-3	
Nombre	Descripción	Código de acceso ^a	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio
METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS								
Pgm2	Fosfoglucomutasa 2	YMR105C	0.0092	2.05	0.16	1.22	0.15	1.43
Glucolisis y gluconeogénesis								
Cdc19 ¹	Piruvato kinasa 1	YAL038W	0.0079	-3.26	0.02	-5.09	0.073	-3.58
Cdc19 ²			0.54	1.19	0.024	-3.32	0.38	-1.22
Cdc19 ³			0.92	-1.02	0.18	1.71	0.028	2.22
Cdc19 ⁴			0.058	-1.65	0.018	-1.36	0.0011	-1.74
Eno1 ¹	Enolasa 1	YGR254W	0.031	-1.71	0.027	-2.4	0.11	-1.54
Eno1 ²			0.022	-1.72	0.04	-2.61	0.059	-1.9
Eno1 ³			0.0069	-1.82	0.72	1.05	0.64	1.08
Eno1 ⁵			0.09	-1.56	0.038	-2.75	0.12	-1.6
Eno1 ⁶			0.22	-1.36	0.044	-2.84	0.11	-1.57
Eno1 ⁷			0.13	-1.73	0.023	-3.41	0.042	-2.1
Eno1 ⁸			0.17	-3.41	0.25	-2.67	0.0024	-5.17
Eno2 ¹	Enolasa 2	YHR174W	0.028	2.46	0.1	1.83	0.0062	1.89
Eno2 ²			0.035	-1.61	0.022	-3.07	0.082	-2.12
Eno2 ³			0.43	1.17	0.019	2.11	0.00045	1.75
Eno2 ⁴			0.94	1.06	0.025	5.24	0.051	2.21
Eno2 ⁶			0.22	1.49	0.04	4.46	0.0055	3.25
Eno2 ⁸			0.28	1.17	0.041	1.82	0.42	-1.08
Eno2 ⁹			0.0056	-2.12	0.11	-2.42	0.025	-3.52
Eno2 ¹⁰			0.19	-1.32	0.018	-2.34	0.18	-1.5
Eno2 ¹¹			0.73	1.07	0.026	2.27	0.027	1.5
Eno2 ¹²			0.77	1.12	0.068	2.92	0.043	1.64
Fba1	Fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa 1	YKL060C	0.042	-1.99	0.24	-2.53	0.062	-2.27
Gpm1	Glicerato fosfomutasa	YKL152C	0.12	-1.84	0.065	-1.42	0.043	-1.9

Tabla 1. Continuación.

Comparación			D14-0/W303-0		D14-1.5/W303-1.5		D14-3/W303-3	
Nombre	Descripción	Código de acceso ^a	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio
Mae1	Enzima málica mitocondrial	YKL029C	0.027	2.74	0.42	1.66	0.25	2.51
Pgk1 ¹	3-Fosfoglicerato kinasa	YCR012W	0.0081	2.12	0.023	1.37	0.24	1.46
Pgk1 ²			0.0072	-2.41	0.0092	-4.57	0.09	-2.17
Pgk1 ⁵			0.46	1.06	0.0095	2.06	0.017	1.77
Pgk1 ⁶			0.34	-1.21	0.047	-2.66	0.23	-1.56
Tdh1 ¹	Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa 1	YJL052W	0.0019	-7.98	0.0052	-7.03	0.017	-4.26
Tdh1 ²			0.0075	-8.89	0.0006	-10.58	7.00E-06	-13.51
Tdh2	Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa 2	YJR009C	0.00061	4.12	0.0015	5.15	0.00058	4.45
Tdh3 ¹	Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa 3	YGR192C	0.0045	17.85	0.0064	45.53	0.01	12.08
Tdh3 ²			0.0064	16.9	0.06	5.85	0.0054	17.05
Tdh3 ³			0.0026	10.47	0.0001	26.83	3.70E-05	16.81
Tdh3 ⁴			0.026	3.08	0.0064	6.26	0.0073	2.58
Tdh3 ⁵			0.032	-1.62	0.28	1.66	0.065	-1.6
Tdh3 ⁶			0.018	-2.56	0.98	-1.2	0.22	-1.43
Tdh3 ⁷			0.0097	-3.26	0.016	-6.38	0.039	-2.09
Tdh3 ⁸			0.003	-3.84	0.022	-3.38	0.0063	-2.42
Tdh3 ⁹			0.0071	-4.02	0.95	-1.34	0.029	-2.43
Tdh3 ¹⁰			0.041	-4.47	0.0018	-6.72	0.00083	-10.54
Tdh3 ¹¹			0.015	-4.72	0.021	-10.87	0.047	-3.85
Tdh3 ¹²			0.0065	-7.44	0.86	-2.43	0.022	-4.01
Tdh3 ¹³			0.035	-20.01	0.017	-19.65	2.60E-05	-45.2
Tdh3 ¹⁵			0.83	1.88	0.045	4.89	0.29	2.07
Tpi1 ¹	Triosa fosfato isomerasa	YDR050C	0.0039	4.93	0.0011	4.47	0.0022	3.9
Tpi1 ²			0.02	1.84	0.31	1.55	0.029	1.96
Fermentación								
Adh1 ¹	Alcohol deshidrogenasa 1	YOL086C	0.00027	9.01	0.0065	6	0.0084	7.55
Adh1 ²			0.00019	3.13	0.14	2.29	0.11	3.08
Adh1 ³			0.00066	-4.71	0.0004	-7.98	0.003	-4.23
Adh1 ⁴			0.00087	-13.46	0.0011	-23.52	0.00081	-26.02
Adh1 ⁵			0.57	-1.2	0.0018	-4.04	0.16	-1.65

Tabla 1. Continuación.

Comparación			D14-0/W303-0		D14-1.5/W303-1.5		D14-3/W303-3	
Nombre	Descripción	Código de acceso ^a	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio
Adh1 ⁶			0.081	3.94	0.0012	4.38	0.039	2.49
Adh1 ⁷			0.17	-1.82	0.027	-3.15	0.024	-2.43
Pdc1 ¹	Piruvato descarboxilasa 1	YLR044C	0.6	1.07	0.0005	-1.81	0.13	-1.35
Pdc1 ²			0.18	1.47	0.014	4.87	0.011	2.54
Pdc1 ³			0.78	1.2	0.017	4.01	0.032	2.06
Pdc1 ⁴			0.52	-1.23	0.045	-3.36	0.15	-1.87
Ruta de los ácidos tricarboxílicos								
Cit1	Citrato sintasa	YNR001C	0.29	-1.4	0.008	2.4	0.0043	1.85
Mdh1	Malato deshidrogenasa	YKL085W	0.071	-1.33	0.049	-2.7	0.49	-1.22
Sdh1	Subunidad de la succinato deshidrogenasa	YKL148C	0.13	1.89	0.042	-2.38	0.49	-1.2
Síntesis de glicerol								
Rhr2	DL-glicerol fosfato fosfatasa	YIL053W	0.012	-1.86	0.021	-2.61	0.029	-2.19
Metabolismo de aminoácidos y bases nitrogenadas								
Ade1	N-succinil-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribótido sintetasa	YAR015W	0.13	1.48	0.029	2.16	0.02	1.84
Adk1	Adenilato kinasa	YDR226W	0.042	3.18	0.0022	5.22	0.00094	2.79
Car1	Arginasa	YPL111W	0.0029	3.92	0.037	2.44	0.0039	4.07
Cys3	Cistationina gamma-liasa 3	YAL012W	0.029	-1.66	0.017	-3.87	0.042	-2.49
Cys4 ¹	Cistationina beta-sintasea 4	YGR155W	0.00018	-2.86	0.0056	-3.9	0.019	-2.99
Cys4 ²			0.39	-1.42	0.045	-4.17	0.054	-4.37
Ilv2	Acetolactato sintasa	YMR108W	0.0083	2.08	0.79	1.25	0.12	3.33
Ilv5	Ácido quetol reductoisomerasa	YLR355C	0.025	2.21	0.11	1.36	0.024	1.79
Imd3	Inosina monofosfato deshidrogenasa	YLR432W	0.33	-1.27	0.017	-3.89	0.11	-2.02
Pro2	Gamma-glutamil fosfato reductasa	YOR323C	0.026	-1.43	0.14	-1.61	0.86	1.03
Shm2 ¹	Serina hidroximetiltransferasa	YLR058C	0.029	3.52	0.23	1.53	0.09	2.31
Shm2 ²			0.78	1.1	0.013	2.77	0.27	1.55
RESPUESTA A ESTRÉS								
Ahp1	Alkil hidroperóxido reductasa 1	YLR109W	0.00077	-2.04	0.0025	-2.44	0.0017	-2.14
Hsp26	Proteína de choque térmico de 26 kDa	YBR072W	0.00038	-18.07	0.0004	-21.4	8.90E-05	-16.1
Oye2	NADPH deshidrogenasa	YHR179W	8.50E-05	-2.99	0.069	-2.68	0.087	-2.73
Oye3	NADPH deshidrogenasa	YPL171C	0.006	-2.52	0.0016	-4.13	0.018	-2.29

Tabla 1. Continuación.

Comparación			D14-0/W303-0		D14-1.5/W303-1.5		D14-3/W303-3	
Nombre	Descripción	Código de acceso ^a	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio
Pil1	Proteína asociada a la membrana plasmática implicada en la biogénesis del eisosoma	YGR086C	0.0083	-1.43	0.0089	-1.69	0.00095	-1.76
Pst2	Proteína secretada por protoplastos	YDR032C	0.0044	-4.88	0.0094	-1.98	0.0031	-4.94
Sod1	Superóxido dismutasa 1	YJR104C	0.0088	-2.99	0.057	-1.6	0.016	-2.04
Sod2	Superóxido dismutasa 2	YHR008C	0.019	-1.66	0.27	-1.35	0.022	-1.64
Ssa1 ¹	ATPasa, proteína de choque térmico de la familia Hsp70	YAL005C	0.057	-1.43	0.031	-1.58	0.0091	-1.55
Ssa1 ²			0.09	-1.49	0.071	1.5	0.016	1.79
Ssb1 ¹	ATPasa, proteína de choque térmico de la familia Hsp70	YNL209W	0.02	2.46	0.002	4.34	0.0022	2.05
Ssb1 ²			0.53	-1.13	0.03	2.74	0.015	1.76
Ssb1 ³			0.84	-1.12	0.045	-3.35	0.91	1
Ssc1	ATPasa, proteína de choque térmico de la familia Hsp70	YJR045C	0.14	-1.66	0.017	-6.69	0.039	-3.77
Yhb1	Flavohemoglobina involucrada en la desintoxicación de óxido nítrico	YGR234W	0.034	-2.87	0.0032	-9.17	0.0075	-4
SÍNTESIS DE PROTEÍNAS								
Eft1	Factor de elongación de la traducción	YOR133W	0.016	-1.58	0.013	-3.9	0.042	-2.86
Hyp2	Factor de iniciación de la traducción	YEL034W	0.47	1.44	0.6	1.2	0.029	2.26
Rps5	Proteína ribosómica de la subunidad pequeña	YJR123W	0.11	3.77	0.053	3.54	0.002	6
Tef1 ¹	Factor de elongación de la traducción	YPR080W	0.0076	2.84	0.03	3.28	0.041	2.61
Tef1 ²			0.02	2.29	0.0035	4.04	0.0022	4.56
Tef2 ²	Factor de elongación de la traducción	YBR118W	0.36	2.17	0.7	1.93	0.048	12.07
Tif3	Factor de iniciación de la traducción	YPR163C	0.79	1.02	0.04	1.34	0.19	1.24
TRANSPORTE CELULAR								
Atp1	ATP sintasa	YBL099W	0.25	1.33	0.002	2.69	0.016	3.11
Qcr2	Ubiquinol-citocromo C reductasa 2	YPR191W	0.042	-3.11	0.014	-4.3	0.015	-2.67
Por1 ¹	Porina 1	YNL055C	0.013	3.55	0.034	2.29	0.039	2.14
Por1 ²			0.02	1.49	0.085	1.61	0.084	1.4
Por1 ³			0.0092	-5.35	0.0001	-7.71	0.0009	-6.82
Por1 ⁴			0.18	1.39	0.015	5.06	0.31	1.81
CRECIMIENTO FILAMENTOSO								
Ach1	Acetil-CoA hidrolasa	YBL015W	0.043	1.84	0.35	1.28	0.012	1.76
Asc1 ¹	Proteína ribosomal de la subunidad 40S	YMR116C	0.013	3.08	0.008	4.04	0.0056	4.1
Asc1 ³			0.16	1.52	0.0085	3.65	0.0012	2.15

Tabla 1. Continuación.

Comparación			D14-0/W303-0		D14-1.5/W303-1.5		D14-3/W303-3	
Nombre	Descripción	Código de acceso ^a	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio
Bmh1	Proteína 14-3-3	YER177W	0.018	1.7	0.24	1.31	0.087	-1.59
OTRAS PROTEÍNAS								
Act1	Actina	YFL039C	0.73	-1.08	0.015	1.76	0.51	1.08
Bfr1	Proteína que suprime brefeldina A	YOR198C	0.2	1.58	0.034	2.18	0.006	4.95
Cdc10	Proteína del anillo de gemación	YCR002C	0.023	1.91	0.0057	1.79	0.005	2.07
Dld3	D-lactato deshidrogenasa	YEL071W	0.16	-1.71	0.029	-3.44	0.1	-2.2
Dug1	Cys-Gly metalo-di-peptidasa	YFR044C	0.036	2.33	0.65	-1.14	0.42	1.67
Egd1	Proteína potenciadora de la unión Gal4-ADN	YPL037C	0.72	-1.04	0.07	1.36	0.00042	2.3
Erg13	3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A sintasa	YML126C	0.0043	-1.76	0.023	-2.09	0.028	-2.33
Grs1	Glicil-tRNA sintetasa	YBR121C	0.017	1.95	0.1	1.64	0.0089	2.91
Npl3	Proteína de unión al ARN	YDR432W	0.21	1.35	0.29	1.21	0.033	1.31
Zuo1	Chaperona asociada a los ribosomas	YGR285C	0.25	1.32	0.48	1.21	0.023	2.33
PROTEÍNAS DE FUNCIÓN DESCONOCIDA								
Msc1	Proteína de función desconocida	YML128C	5.80E-05	-7.24	0.0016	-7.15	0.00012	-6.24
Om45 ¹	Proteína de membrana externa de 45 kDa	YIL136W	0.0037	4.48	0.0032	6.26	0.0017	5.86
Om45 ²			0.00068	-3.64	0.0004	-3.26	0.00053	-2.86
Tma20	Proteína asociada a las ribosomas	YER007C-A	0.032	-2.59	0.91	1.01	0.011	-3.05
YNL134C ¹	Proteína de función desconocida	YNL134C	0.01	-2.47	0.012	-5.66	0.0091	-3.83
YNL134C ²			0.0016	-3.3	0.16	-2.41	0.0033	-2.68
MEZCLAS DE PROTEÍNAS								
Cdc19+Tdh1 ^b	Piruvato kinasa 1 + Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa 1	YAL038W + YJL052W	0.075	-2.77	0.31	-1.83	0.0027	-3.22
Eno2+Act1 ^b	Enolasa 2 + Actina	YHR174W + YFL039C	0.073	-2.02	0.0048	-4.42	0.031	-3.89
Hxk2+Hxk1 ^b	Hexoquinasa 1 + Hexoquinasa 2	YGL253W + YFR053C	0.079	1.87	0.66	-1.17	0.04	2.12
Pdc1+Eno1 ^b	Piruvato descarboxilasa 1 + Enolasa 1	YLR044C + YGR254W	0.053	1.5	0.037	2.04	0.058	2.43
Pgk1+Cit1 ^b	3-Fosfoglicerato kinasa + Citrato sintasa	YCR012W + YNR001C	0.2	-1.31	0.034	-3.15	0.17	-1.72
Tef4+Pgk1 ^b	Factor de elongación de la traducción + 3-Fosfoglicerato kinasa	YKL081W + YCR012W	0.6	1.15	0.9	-1.05	0.0049	1.81

^a código de acceso de la base de datos SGD 09; ^b manchas proteicas identificadas como una mezcla de proteínas; ¹⁻¹⁵ corresponden a las diferentes manchas proteicas de la misma proteína. Para una mejor visualización de los resultados las manchas proteicas con un aumento de ratio y t-test significativo se han marcado con celdas en rojo y en las que hay disminución se han marcado con celdas en verde.

Tabla 2. Proteínas de *S. cerevisiae* que aumentan o disminuyen su abundancia con los valores de ratio y T-test en las comparaciones: D14 t=0 frente W303 t=0; D14 t=1.5h frente W303 t=1.5h; D14 t=3h frente W303 t=3h.

Comparación			D14-0/W303-0		D14-1.5/W303-1.5		D14-3/W303-3	
Nombre	Descripción	Código de acceso ^a	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio
SISTEMA DEL COMPLEMENTO								
CFB	Factor B del complemento	sp P00751 CFAB_HUMAN	0.76	1.01	0.046	-4.16	0.82	-1.05
C3 ⁴	Proteína C3 del complemento	sp P01024 CO3_HUMAN	0.93	-1.04	0.83	-1.05	0.014	1.42
C3 ⁶			0.9	1.05	0.017	-1.33	0.48	-1.34
OTRAS PROTEÍNAS								
FGB	Fibrinógeno	sp P02675 FIBB_HUMAN	0.059	-1.61	0.51	-1.27	0.041	-1.99
IGHG1	Región C de la IgG1	sp P01857 IGHG1_HUMAN	0.013	1.64	0.032	2.85	0.099	1.72

^a código de acceso de la base de datos UniProtKB-SwissProt sp|P00751|CFAB_HUMAN; ¹⁻⁶ corresponden a las diferentes manchas proteicas de la misma proteína. Para una mejor visualización de los resultados las manchas proteicas con un aumento de ratio y t-test significativo se han marcado con celdas en rojo y en las que hay disminución se han marcado con celdas en verde.

Tabla 3. Proteínas de *S. cerevisiae* que aumentan o disminuyen su abundancia a lo largo del tiempo como consecuencia de la interacción con sangre. Se muestran los valores de ratio y T-test de las comparaciones: D14 t=1.5h frente D14 t=0; D14 t=3h frente D14 t=0; W303 t=1.5h frente W303 t=0; W303 t=3h frente W303 t=0.

Comparación			D14-1.5/D14-0		D14-3/D14-0		W303-1.5/W303-0		W303-3/W303-0	
Nombre	Descripción	Código de acceso ^a	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio
METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS										
Glucolisis y gluconeogénesis										
Cdc19 ²	Piruvato kinasa 1	YAL038W	0.69	-1.1	0.67	1.19	0.013	3.59	0.099	1.72
Cdc19 ³			0.75	-1.07	0.77	1.09	0.15	-1.86	0.021	-2.09
Eno2 ³	Enolasa 2	YHR174W	0.49	-1.14	0.73	-1.08	0.03	-2.05	0.0092	-1.61
Eno2 ⁴			0.62	1.24	0.43	1.35	0.022	-3.98	0.06	-1.55
Eno2 ⁵			0.91	-1.08	0.91	-1.01	0.064	-2.12	0.05	-1.36
Eno2 ⁶			0.19	1.37	0.42	1.22	0.15	-2.18	0.04	-1.78
Pgk1 ¹	3-Fosfoglicerato kinasa	YCR012W	0.014	-1.84	0.41	-1.23	0.16	-1.19	0.31	1.18
Pgk1 ³			0.045	1.12	0.32	1.12	0.031	-1.72	0.042	-1.49
Tdh3 ⁵	Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa 3	YGR192C	0.018	1.39	0.42	-1.14	0.12	-1.93	0.45	-1.15
Tdh3 ⁶			0.96	-1	0.81	-1.09	0.11	-2.13	0.024	-1.95
Tdh3 ⁷			0.039	-1.37	0.48	-1.12	0.55	1.43	0.2	-1.75
Fermentación										
Adh1 ³	Alcohol deshidrogenasa 1	YOL086C	0.04	-1.37	0.82	1.1	0.41	1.24	0.96	-1.01
Adh1 ⁵			0.036	-2.28	0.56	-1.21	0.095	1.47	0.44	1.14
Adh1 ⁶			0.011	2.68	0.15	1.73	0.088	2.41	0.093	2.74
Pdc1 ¹	Piruvato descarboxilasa, isozima 1	YLR044C	0.052	-1.43	0.52	-1.13	0.023	1.36	0.12	1.28
Pdc1 ²			0.49	1.14	0.57	1.14	0.042	-2.91	0.068	-1.52
Pdc1 ³			0.57	-1.13	0.83	-1.03	0.12	-2.34	0.048	-1.42
Ruta de los ácidos tricarboxílicos										
Cit1	Citrato sintasa	YNR001C	0.016	2.81	0.046	2.06	0.48	-1.19	0.31	-1.26
Sdh1	Subunidad de la succinato deshidrogenasa	YKL148C	0.2	-2.18	0.35	-1.55	0.018	2.06	0.11	1.45
Metabolismo de aminoácidos y bases nitrogenadas										
Cys4 ²	Cistationina beta-sintasea 4	YGR155W	0.95	-1.02	0.61	1.43	0.1	2.87	0.031	4.4
Ilv2	Acetolactato sintasa	YMR108W	0.83	1.02	0.69	1.51	0.032	1.71	0.74	-1.06

Tabla 3. Continuación.

Comparación			D14-1.5/D14-0		D14-3/D14-0		W303-1.5/W303-0		W303-3/W303-0	
Nombre	Descripción	Código de acceso ^a	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio
RESPUESTA A ESTRÉS										
Imd2	Inosina monofosfato deshidrogenasa	YHR216W	0.11	2.66	0.26	1.59	0.0072	1.97	0.033	1.44
Pil1	Proteína implicada en la biogénesis del eisosoma	YGR086C	0.063	-1.25	0.017	-1.38	0.56	-1.06	0.11	-1.12
Pst2	Proteína secretada por protoplastos	YDR032C	0.12	1.73	0.82	-1.12	0.021	-1.43	0.48	-1.11
Sod1	Superóxido dismutasa 1	YJR104C	0.46	1.25	0.63	1.15	0.034	-1.49	0.13	-1.28
Ssa1 ¹	ATPasa, proteína de choque térmico de la familia Hsp70	YAL005C	0.0009	-1.5	0.038	-1.21	0.16	-1.36	0.52	-1.12
Ssa1 ²			0.13	1.57	0.09	1.66	0.0065	-1.42	0.00069	-1.61
Ssa1 ³			0.0098	-1.16	0.0031	-1.23	0.041	1.61	0.31	1.12
Ssb1 ²	ATPasa, proteína de choque térmico de la familia Hsp70	YNL209W	0.061	1.55	0.037	1.61	0.085	-1.99	0.32	-1.23
SÍNTESIS DE PROTEÍNAS										
Eft1	Factor de elongación de la traducción EF-2	YOR133W	0.22	-1.78	0.54	-1.24	0.013	1.39	0.032	1.46
Hyp2	Factor de iniciación de la traducción	YEL034W	0.52	-1.39	0.42	-1.5	0.6	-1.15	0.025	-2.36
Tef2 ¹	Factor de elongación de la traducción	YBR118W	0.41	-2.14	0.55	-1.58	0.82	-1.84	0.042	-13.76
Tif3	Factor de iniciación de la traducción	YPR163C	0.31	-1.14	0.58	-1.07	0.0005	-1.49	0.015	-1.3
TRANSPORTE CELULAR										
Atp3	ATP sintasa	YBR039W	0.12	1.23	0.097	1.45	0.0014	1.98	0.67	1.17
Por1 ⁴	Porina 1	YNL055C	0.044	1.91	0.38	1.52	0.13	-1.9	0.46	1.17
Por1 ⁵			0.79	-1.05	0.49	-1.13	0.032	-1.53	0.04	-1.5
CRECIMIENTO FILAMENTOSO										
Asc1 ¹	Proteína ribosomal de la subunidad 40S	YMR116C	0.97	-1.01	0.81	-1.1	0.049	-1.32	0.059	-1.46
Asc1 ²			0.36	-1.44	0.36	-1.38	0.026	1.85	0.21	1.58
Bmh1	Proteína de la familia 14-3-3	YER177W	0.51	-1.12	0.041	-1.54	0.27	1.16	0.048	1.75
OTRAS PROTEÍNAS										
Act1	Actina	YFL039C	0.76	1.04	0.89	-1.01	0.038	-1.84	0.46	-1.18
Bfr1	Proteína que suprime brefeldina A	YOR198C	0.64	-1.17	0.82	-1.07	0.12	-1.61	0.0093	-3.35
Cdc10	Proteína del anillo de gemación	YCR002C	0.068	-1.64	0.35	-1.19	0.018	-1.53	0.12	-1.29
Egd1	Proteína potenciadora de la unión Gal4-ADN	YPL037C	0.8	1.01	0.41	1.22	0.028	-1.39	0.0008	-1.96

Tabla 3. Continuación.

Comparación			D14-1.5/D14-0		D14-3/D14-0		W303-1.5/W303-0		W303-3/W303-0		
Nombre	Descripción	Código de acceso ^a	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	
Wtm1	Modulador de la transcripción implicado en la regulación de la meiosis	YOR230W	0.28	-1.52	0.52	-1.23	0.98	1.04	0.028	-1.59	
Zuo1	Chaperona asociada a los ribosomas	YGR285C	0.64	-1.12	0.58	-1.15	0.77	-1.03	0.011	-2.04	
PROTEÍNAS DE FUNCIÓN DESCONOCIDA											
Msc1	Proteína de función desconocida	YML128C	0.37	-1.21	0.17	-1.22	0.25	-1.23	0.035	-1.42	
Pet10	Proteína de función desconocida	YKR046C	0.59	-1.13	0.22	-1.3	0.0069	-1.36	0.0076	-1.47	
MEZCLAS DE PROTEÍNAS											
Tef4+Pgk1 ^b	Factor de elongación de la traducción + 3-Fosfoglicerato kinasa	YKL081W YCR012W	+	0.71	-1.11	0.95	-1.04	0.77	1.09	0.041	-1.63

^a código de acceso de la base de datos SGD 09; ^b manchas proteicas identificadas como una mezcla de proteínas; ¹⁻⁷ corresponden a las diferentes manchas proteicas de la misma proteína. Para una mejor visualización de los resultados las manchas proteicas con un aumento de ratio y t-test significativo se han marcado con celdas en rojo y en las que hay disminución se han marcado con celdas en verde.

Tabla 4. Proteínas humanas que aumentan su abundancia a lo largo del tiempo como consecuencia de la interacción con sangre. Se muestran los valores de ratio y T-test de las comparaciones: D14 t=1.5h frente D14 t=0; D14 t=3h frente D14 t=0; W303 t=1.5h frente W303 t=0; W303 t=3h frente W303 t=0.

Comparación			D14-1.5/D14-0		D14-3/D14-0		W303-1.5/W303-0		W303-3/W303-0	
Nombre	Descripción	Código de acceso ^a	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio
SISTEMA DEL COMPLEMENTO										
C3 ¹	Proteína C3 del complemento	sp P01024 CO3_HUMAN	0.024	6.92	0.014	5.33	0.015	18.16	0.045	4.49
C3 ²			0.12	3.93	0.091	2.41	0.0052	16.41	0.012	4.58
C3 ³			0.32	2.55	0.12	3.21	0.0025	9.15	0.0042	3.66
C3 ⁴			0.0035	2.6	0.00044	2.2	0.027	2.62	0.18	1.49
C3 ⁵			0.0088	3.27	0.0099	2.66	0.006	4.51	0.004	2.78
C3 ⁶			0.001	7.79	0.0013	6.91	0.0039	10.8	0.052	9.71
CFB	Factor B del complemento	sp P00751 CFAB_HUMAN	0.48	1.4	0.85	-1.02	0.02	5.86	0.7	1.03
CFP ¹	Properdina	sp P27918 PROP_HUMAN	0.0062	6.73	0.011	5.48	0.00012	13.34	0.00016	11.25
CFP ²			0.41	1.2	0.54	1.14	0.016	5.94	0.077	4.2
OTRAS PROTEÍNAS										
FGB	Fibrinogeno	sp P02675 FIBB_HUMAN	0.14	1.5	0.03	1.67	0.67	1.18	0.044	2.06
IGHG1	Región C de la IgG1	sp P01857 IGHG1_HUMAN	0.004	3.37	0.025	2.15	0.12	1.94	0.016	2.05

^a código de acceso de la base de datos UniProtKB-SwissProt sprot_160909; ¹⁻⁶ corresponden a las diferentes manchas proteicas de la misma proteína. Para una mejor visualización de los resultados las manchas proteicas con un aumento de ratio y t-test significativo se han marcado con celdas en rojo.

Anexo III.

Los diferentes grupos de proteínas con variación de abundancia se analizaron mediante el programa Funspec para realizar una evaluación estadística de la lista de proteínas identificadas respecto a anotaciones funcionales ya existentes en las bases de datos. El *p-value*, calculado usando un modelo de distribución hipergeométrica (Robinson y col., 2002), representa la probabilidad de que la intersección de la lista dada con cualquier categoría funcional se produzca por casualidad, considerando un *p-value* estadísticamente significativo cuando es menor o igual a 0.01 lo que indica la existencia de evidencias de un enriquecimiento funcional.

Tabla 1. Análisis funcional de proteínas obtenido a partir del programa funspec de las proteínas que disminuyen su abundancia en la cepa D14 en la comparación D14-t=0/W303-t=0 respecto a las anotaciones GO *Biological Process* y MIPS *Functional Classification*.

GO Biological Process (2062 categories)				
Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
oxidation-reduction process [GO:0055114]	8.501e-09	PST2 YHB1 SOD2 OYE2 TDH1 SOD1 AHP1 YNL134C PRO2 OYE3	10	272
metabolic process [GO:0008152]	5.884e-07	CDC19 CYS4 OYE2 RHR2 TDH1 FBA1 ERG13 YNL134C PRO2 OYE3	10	425
glycolysis [GO:0006096]	2.168e-06	CDC19 ENO1 TDH1 FBA1	4	28
age-dependent response to reactive oxygen species involved in chronological cell aging [GO:0001320]	1.161e-05	SOD2 SOD1	2	2
cysteine biosynthetic process via cystathionine [GO:0019343]	1.161e-05	CYS3 CYS4	2	2
gluconeogenesis [GO:0006094]	2.912e-05	ENO1 TDH1 FBA1	3	18
transsulfuration [GO:0019346]	6.935e-05	CYS3 CYS4	2	4
superoxide metabolic process [GO:0006801]	0.0001153	SOD2 SOD1	2	5
cysteine biosynthetic process [GO:0019344]	0.00075	CYS3 CYS4	2	12
apoptosis [GO:0006915]	0.00257	OYE2 OYE3	2	22
hydrogen sulfide biosynthetic process [GO:0070814]	0.003483	CYS4	1	1
cellular amino acid biosynthetic process [GO:0008652]	0.004526	CYS3 CYS4 PRO2	3	98
cysteine biosynthetic process from serine [GO:0006535]	0.006955	CYS4	1	2
oxygen transport [GO:0015671]	0.006955	YHB1	1	2
positive regulation of sequence-specific DNA binding transcription factor activity [GO:0051091]	0.006955	SOD1	1	2
cysteine metabolic process [GO:0006534]	0.006955	CYS3	1	2

Tabla1. Continuación.

MIPS Functional Classification (459 categories)

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
glycolysis and gluconeogenesis [02.01]	2.224e-07	CDC19 ENO1 TDH1 FBA1 YNL134C	5	41
superoxide metabolism [32.07.07.07]	1.161e-05	SOD2 SOD1	2	2
oxidative stress response [32.01.01]	3.393e-05	PST2 SOD2 SOD1 AHP1	4	55
biosynthesis of cysteine [01.01.09.03.01]	6.935e-05	CYS3 CYS4	2	4
sugar, glucoside, polyol and carboxylate catabolism [01.05.02.07]	0.0001559	CDC19 ENO1 TDH1 FBA1	4	81
FAD/FMN binding [16.21.05]	0.0003209	OYE2 OYE3	2	8
energy conversion and regeneration [02.45]	0.00075	OYE2 OYE3	2	12
degradation of homocysteine [01.01.06.05.01.02]	0.003483	CYS4	1	1

Legend

Number of Genes in each Database: 6603. **k**: number of genes from the input cluster in given category. **f**: number of genes total in given category. The p-values represent the probability that the intersection of a given list with any given functional category occurs by chance. The Bonferroni-correction divides the p-value threshold, that would be deemed significant for an individual test, by the number of tests conducted and thus accounts for spurious significance due to multiple testing over the categories of a database.

Tabla 2. Análisis funcional de proteínas obtenido a partir del programa funspec de las proteínas que aumentan su abundancia en la cepa D14 en la comparación D14-t=0/W303-t=0 respecto a las anotaciones GO *Biological Process* y MIPS *Funcional Classification*.

GO Biological Process (2062 categories)

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
branched chain family amino acid biosynthetic process [GO:0009082]	0.0004786	ILV5 ILV2	2	13
gluconeogenesis [GO:0006094]	0.0009318	TPI1 TDH2	2	18
glucose metabolic process [GO:0006006]	0.001529	TDH2 PGM2	2	23
glycolysis [GO:0006096]	0.002267	TPI1 TDH2	2	28
mitochondrial glycyl-tRNA aminoacylation [GO:0070150]	0.002575	GRS1	1	1
regulation of ornithine metabolic process [GO:0090368]	0.002575	CAR1	1	1
arginine catabolic process to ornithine [GO:0019547]	0.002575	CAR1	1	1
acetyl-CoA metabolic process [GO:0006084]	0.002575	ACH1	1	1
ADP biosynthetic process [GO:0006172]	0.002575	ADK1	1	1
L-serine metabolic process [GO:0006563]	0.005143	SHM2	1	2
glycyl-tRNA aminoacylation [GO:0006426]	0.005143	GRS1	1	2
glucose 1-phosphate metabolic process [GO:0019255]	0.005143	PGM2	1	2
acetate metabolic process [GO:0006083]	0.005143	ACH1	1	2
UDP-glucose metabolic process [GO:0006011]	0.007705	PGM2	1	3
galactose catabolic process [GO:0019388]	0.007705	PGM2	1	3
nucleotide phosphorylation [GO:0046939]	0.007705	ADK1	1	3
negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in mitotic cell cycle [GO:0051436]	0.007705	BMH1	1	3

MIPS Functional Classification (459 categories)

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
biosynthesis of valine [01.01.11.03.01]	9.303e-05	ILV5 ILV2	2	6
glycolysis and gluconeogenesis [02.01]	0.0001423	TPI1 TDH2 PGM2	3	41

Tabla2. Continuación.

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
sugar, glucoside, polyol and carboxylate catabolism [01.05.02.07]	0.001068	TPI1 TDH2 PGM2	3	81
purin nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism [01.03.01]	0.002602	ADK1 SHM2	2	30
degradation of arginine [01.01.03.05.02]	0.005143	CAR1	1	2
metabolism of the pyruvate family (alanine, isoleucine, leucine, valine) and D-alanine [01.01.11]	0.005143	MAE1	1	2
hyphae formation [43.01.03.06]	0.005143	ACH1	1	2
metabolism of vitamins, cofactors, and prosthetic groups [01.07]	0.005295	ACH1 SHM2	2	43
C-1 compound anabolism [01.05.05.04]	0.007705	SHM2	1	3
metabolism of energy reserves (e.g. glycogen, trehalose) [02.19]	0.008855	BMH1 PGM2	2	56

Legend

Number of Genes in each Database: 6603. **k**: number of genes from the input cluster in given category. **f**: number of genes total in given category. The p-values represent the probability that the intersection of a given list with any given functional category occurs by chance. The Bonferroni-correction divides the p-value threshold, that would be deemed significant for an individual test, by the number of tests conducted and thus accounts for spurious significance due to multiple testing over the categories of a database.

Tabla 3. Análisis funcional de proteínas obtenido a partir del programa funspec de las proteínas que disminuyen su abundancia en la cepa D14 en la comparación D14-t=1.5/W303-t=1.5 respecto a las anotaciones GO *Biological Process* y MIPS *Functional Classification*.

GO Biological Process (2062 categories)

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
oxidation-reduction process [GO:0055114]	1.317e-07	YHB1 TDH1 MDH1 SDH1 ERG3 AHP1 IMD3 OYE3	8	272
cysteine biosynthetic process via cystathionine [GO:0019343]	6.24e-06	CYS3 CYS4	2	2
transsulfuration [GO:0019346]	3.732e-05	CYS3 CYS4	2	4
glycolysis [GO:0006096]	4.464e-05	CDC19 ENO1 TDH1	3	28
metabolic process [GO:0008152]	4.813e-05	CDC19 CYS4 RHR2 TDH1 MDH1 IMD3 OYE3	7	425
cysteine biosynthetic process [GO:0019344]	0.0004056	CYS3 CYS4	2	12
gluconeogenesis [GO:0006094]	0.0009318	ENO1 TDH1	2	18
hydrogen sulfide biosynthetic process [GO:0070814]	0.002575	CYS4	1	1
tricarboxylic acid cycle [GO:0006099]	0.002602	MDH1 SDH1	2	30
cysteine metabolic process [GO:0006534]	0.005143	CYS3	1	2
oxygen transport [GO:0015671]	0.005143	YHB1	1	2
cysteine biosynthetic process from serine [GO:0006535]	0.005143	CYS4	1	2
response to stress [GO:0006950]	0.006416	HSP26 YHB1 SSC1	3	152
electron transport chain [GO:0022900]	0.006834	SDH1 QCR2	2	49
positive regulation of endodeoxyribonuclease activity [GO:0032079]	0.007705	SSC1	1	3
glycerol biosynthetic process [GO:0006114]	0.007705	RHR2	1	3
GTP biosynthetic process [GO:0006183]	0.007705	IMD3	1	3
protein unfolding [GO:0043335]	0.007705	SSC1	1	3

Tabla 3. Continuación.

MIPS Functional Classification (459 categories)

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
sugar, glucoside, polyol and carboxylate catabolism [01.05.02.07]	1.352e-06	CDC19 ENO1 TDH1 MDH1 SDH1	5	81
biosynthesis of cysteine [01.01.09.03.01]	3.732e-05	CYS3 CYS4	2	4
glycolysis and gluconeogenesis [02.01]	0.0001423	CDC19 ENO1 TDH1	3	41
degradation of homocysteine [01.01.06.05.01.02]	0.002575	CYS4	1	1
tricarboxylic-acid pathway (citrate cycle, Krebs cycle, TCA cycle) [02.10]	0.002777	MDH1 SDH1	2	31
electron transport and membrane-associated energy conservation [02.11]	0.009476	SDH1 QCR2	2	58

Legend

Number of Genes in each Database: 6603. **k**: number of genes from the input cluster in given category. **f**: number of genes total in given category. The p-values represent the probability that the intersection of a given list with any given functional category occurs by chance. The Bonferroni-correction divides the p-value threshold, that would be deemed significant for an individual test, by the number of tests conducted and thus accounts for spurious significance due to multiple testing over the categories of a database.

Tabla 4. Análisis funcional de proteínas obtenido a partir del programa funspec de las proteínas que aumentan su abundancia en la cepa D14 en la comparación D14-t=1.5/W303-t=1.5 respecto a las anotaciones GO *Biological Process* y MIPS *Functional Classification*.

GO Biological Process (2062 categories)

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
ADP biosynthetic process [GO:0006172]	0.001666	ADK1	1	1
acetyl-CoA catabolic process [GO:0046356]	0.001666	CIT1	1	1
L-serine metabolic process [GO:0006563]	0.003329	SHM2	1	2
vesicle transport along actin filament [GO:0030050]	0.003329	ACT1	1	2
citrate metabolic process [GO:0006101]	0.00499	CIT1	1	3
lactate metabolic process [GO:0006089]	0.00499	DLD3	1	3
nucleotide phosphorylation [GO:0046939]	0.00499	ADK1	1	3
actin filament reorganization involved in cell cycle [GO:0030037]	0.006649	ACT1	1	4
glycine metabolic process [GO:0006544]	0.006649	SHM2	1	4
contractile ring contraction involved in cell cycle cytokinesis [GO:0000916]	0.006649	ACT1	1	4
mRNA metabolic process [GO:0016071]	0.006649	BFR1	1	4
ATP metabolic process [GO:0046034]	0.006649	ATP1	1	4
glucose mediated signaling pathway [GO:0010255]	0.008304	ASC1	1	5

MIPS Functional Classification (459 categories)

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
cytokinesis (cell division) /septum formation and hydrolysis [10.03.03]	0.0001848	ADK1 ACT1 BFR1	3	71
purin nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism [01.03.01]	0.00107	ADK1 SHM2	2	30
bud / growth tip [42.29]	0.001143	ACT1 BFR1	2	31
actin dependent transport [20.09.14.02]	0.001666	ACT1	1	1
spindle pole body/centrosome and microtubule cycle [10.03.05.01]	0.002095	ACT1 BFR1	2	42
C-1 compound anabolism [01.05.05.04]	0.00499	SHM2	1	3

Tabla 4. Continuación.

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
lactate fermentation [02.16.03]	0.006649	DLD3	1	4
PROTEIN WITH BINDING FUNCTION OR COFACTOR REQUIREMENT (structural or catalytic) [16]	0.008304	ACT1	1	5
degradation of lysine [01.01.06.06.02]	0.008304	SHM2	1	5
degradation of glycine [01.01.09.01.02]	0.009958	SHM2	1	6

Legend

Number of Genes in each Database: 6603. **k**: number of genes from the input cluster in given category. **f**: number of genes total in given category. The p-values represent the probability that the intersection of a given list with any given functional category occurs by chance. The Bonferroni-correction divides the p-value threshold, that would be deemed significant for an individual test, by the number of tests conducted and thus accounts for spurious significance due to multiple testing over the categories of a database.

Tabla 5. Análisis funcional de proteínas obtenido a partir del programa funspec de las proteínas que disminuyen su abundancia en la cepa D14 en la comparación D14-t=3/W303-t=3 respecto a las anotaciones GO *Biological Process* y MIPS *Functional Classification*.

GO Biological Process (2062 categories)

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
cysteine biosynthetic process via cystathionine [GO:0019343]	2.523e-06	CYS3 CYS4	2	2
transsulfuration [GO:0019346]	1.511e-05	CYS3 CYS4	2	4
cysteine biosynthetic process [GO:0019344]	0.000165	CYS3 CYS4	2	12
metabolic process [GO:0008152]	0.0003604	CYS4 RHR2 GPM1 ERG13 YNL134C	5	425
gluconeogenesis [GO:0006094]	0.0003805	ENO1 GPM1	2	18
glycolysis [GO:0006096]	0.0009315	ENO1 GPM1	2	28
hydrogen sulfide biosynthetic process [GO:0070814]	0.001666	CYS4	1	1
cysteine metabolic process [GO:0006534]	0.003329	CYS3	1	2
cysteine biosynthetic process from serine [GO:0006535]	0.003329	CYS4	1	2
oxygen transport [GO:0015671]	0.003329	YHB1	1	2
glycerol biosynthetic process [GO:0006114]	0.00499	RHR2	1	3
negative regulation of protein kinase activity [GO:0006469]	0.006649	PIL1	1	4
response to toxin [GO:0009636]	0.008304	YHB1	1	5
sulfur amino acid metabolic process [GO:0000096]	0.008304	CYS3	1	5

MIPS Functional Classification (459 categories)

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
biosynthesis of cysteine [01.01.09.03.01]	1.511e-05	CYS3 CYS4	2	4
glycolysis and gluconeogenesis [02.01]	3.543e-05	ENO1 GPM1 YNL134C	3	41
degradation of homocysteine [01.01.06.05.01.02]	0.001666	CYS4	1	1
C-compound and carbohydrate metabolism [01.05]	0.005129	ENO1 RHR2 YNL134C	3	223
sugar, glucoside, polyol and carboxylate catabolism [01.05.02.07]	0.007609	ENO1 GPM1	2	81

Legend

Number of Genes in each Database: 6603. **k**: number of genes from the input cluster in given category. **f**: number of genes total in given category. The p-values represent the probability that the intersection of a given list with any given functional category occurs by chance. The Bonferroni-correction divides the

p-value threshold, that would be deemed significant for an individual test, by the number of tests conducted and thus accounts for spurious significance due to multiple testing over the categories of a database.

Tabla 6. Análisis funcional de proteínas obtenido a partir del programa funspec de las proteínas que disminuyen su abundancia en la cepa D14 en la comparación D14-t=3/W303-t=3 respecto a las anotaciones GO *Biological Process* y MIPS *Functional Classification*.

GO Biological Process (2062 categories)				
Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
regulation of translational fidelity [GO:0006450]	9.028e-07	SSB1 ZUO1 RPS5	3	10
translational elongation [GO:0006414]	1.141e-05	TEF2 HYP2 TEF1	3	22
translation [GO:0006412]	2.574e-05	TEF2 GRS1 SSB1 HYP2 RPS5 TEF1	6	318
'de novo' cotranslational protein folding [GO:0051083]	4.16e-05	SSB1 EGD1	2	5
ribosomal subunit export from nucleus [GO:0000054]	0.0003213	SSB1 ZUO1	2	13
translational termination [GO:0006415]	0.0003744	SSB1 NPL3	2	14
tRNA export from nucleus [GO:0006409]	0.0007761	TEF2 TEF1	2	20
mitochondrial glycyl-tRNA aminoacylation [GO:0070150]	0.00212	GRS1	1	1
acetyl-CoA catabolic process [GO:0046356]	0.00212	CIT1	1	1
regulation of transcription termination, DNA-dependent [GO:0031554]	0.00212	NPL3	1	1
positive regulation of translational initiation [GO:0045948]	0.00212	HYP2	1	1
GTP catabolic process [GO:0006184]	0.002123	TEF2 TEF1	2	33
positive regulation of translational termination [GO:0045905]	0.004236	HYP2	1	2
glycyl-tRNA aminoacylation [GO:0006426]	0.004236	GRS1	1	2
positive regulation of translational elongation [GO:0045901]	0.006348	HYP2	1	3
citrate metabolic process [GO:0006101]	0.006348	CIT1	1	3
rRNA processing [GO:0006364]	0.007258	SSB1 NPL3 ZUO1	3	195
peptidyl-lysine modification to hypusine [GO:0008612]	0.008456	HYP2	1	4
reactive oxygen species metabolic process [GO:0072593]	0.008456	TDH2	1	4
transcription termination, DNA-dependent [GO:0006353]	0.008456	GRS1	1	4
ATP metabolic process [GO:0046034]	0.008456	ATP1	1	4

MIPS Functional Classification (459 categories)				
Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
unfolded protein response (e.g. ER quality control) [32.01.07]	0.0003661	SSB1 ZUO1 EGD1	3	69
translation elongation [12.04.02]	0.0008568	TEF2 TEF1	2	21
protein binding [16.01]	0.007535	SSB1 HYP2 ZUO1 EGD1	4	391

Legend

Number of Genes in each Database: 6603. **k**: number of genes from the input cluster in given category. **f**: number of genes total in given category. The p-values represent the probability that the intersection of a given list with any given functional category occurs by chance. The Bonferroni-correction divides the p-value threshold, that would be deemed significant for an individual test, by the number of tests conducted and thus accounts for spurious significance due to multiple testing over the categories of a database.

Anexo IV.

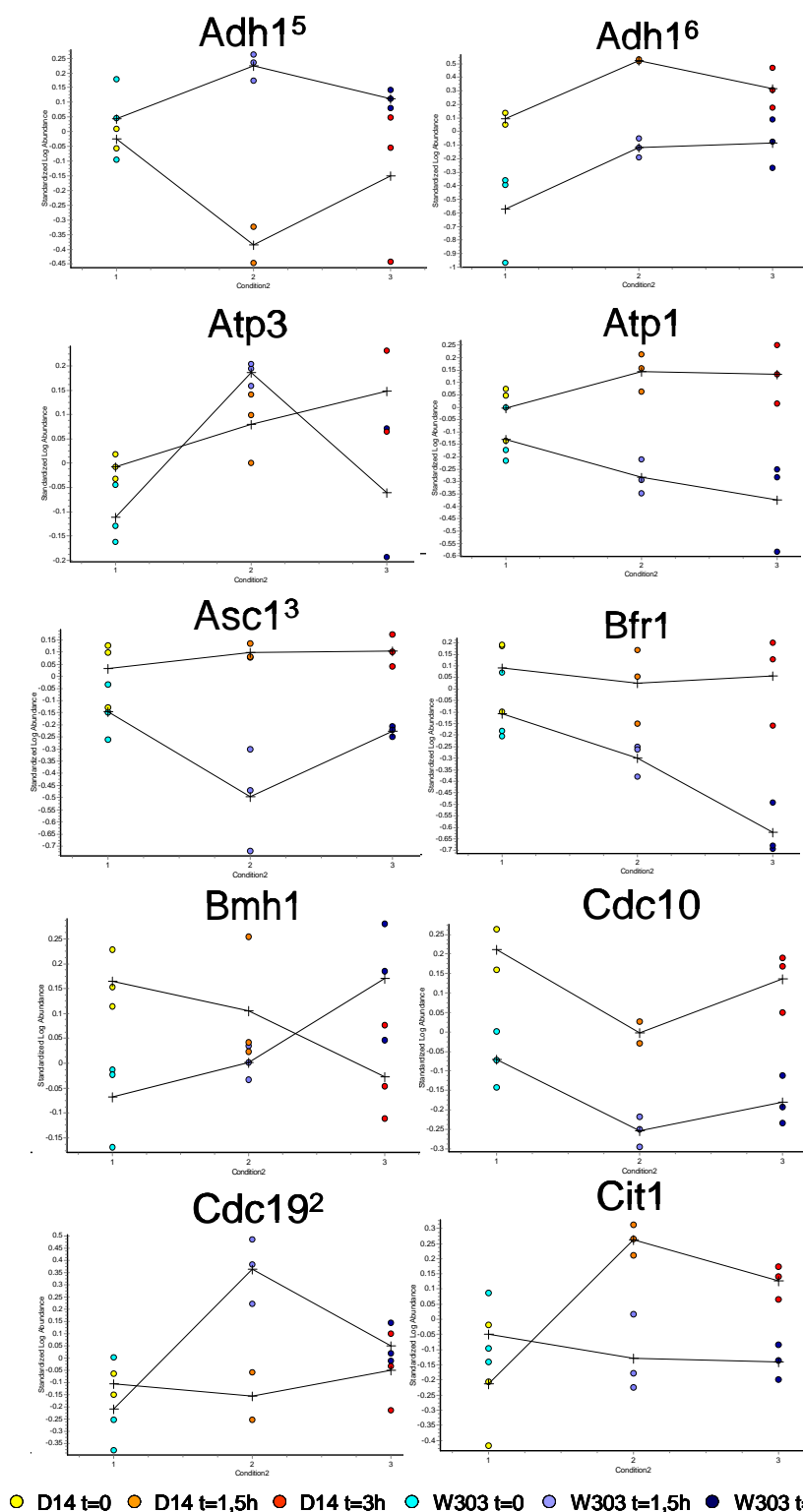


Figura 1. Gráficas que representan el comportamiento de las proteínas de *S. cerevisiae* en el análisis 2D-DIGE, mostrándose la variación de abundancia en cada cepa a lo largo del tiempo en cada uno de los geles empleados. Se han incluido las proteínas que muestran variación de abundancia en las comparaciones entre múltiples condiciones. Estas imágenes han sido tomadas del *software* DeCyder.

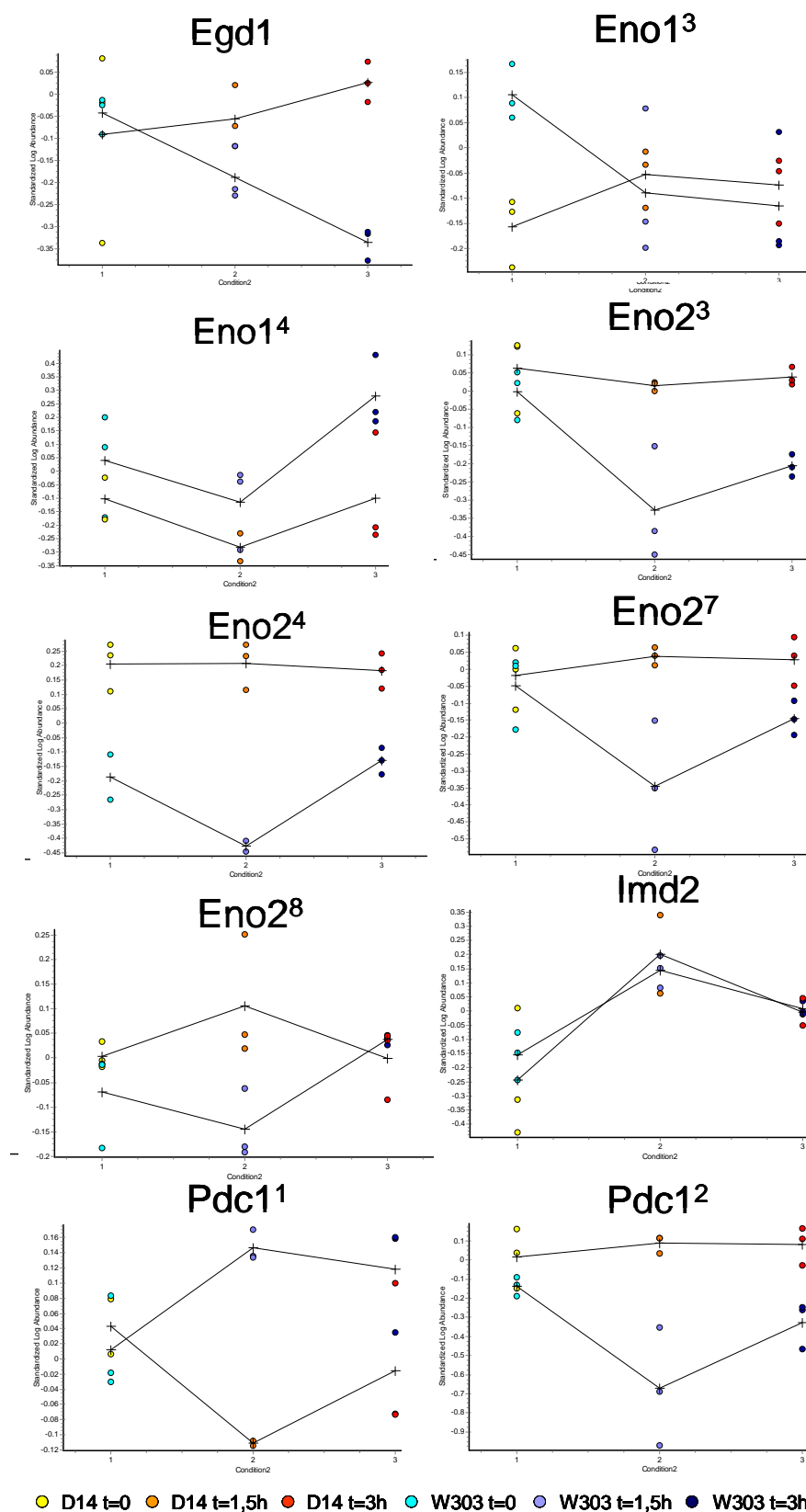


Figura 1. Continuación.

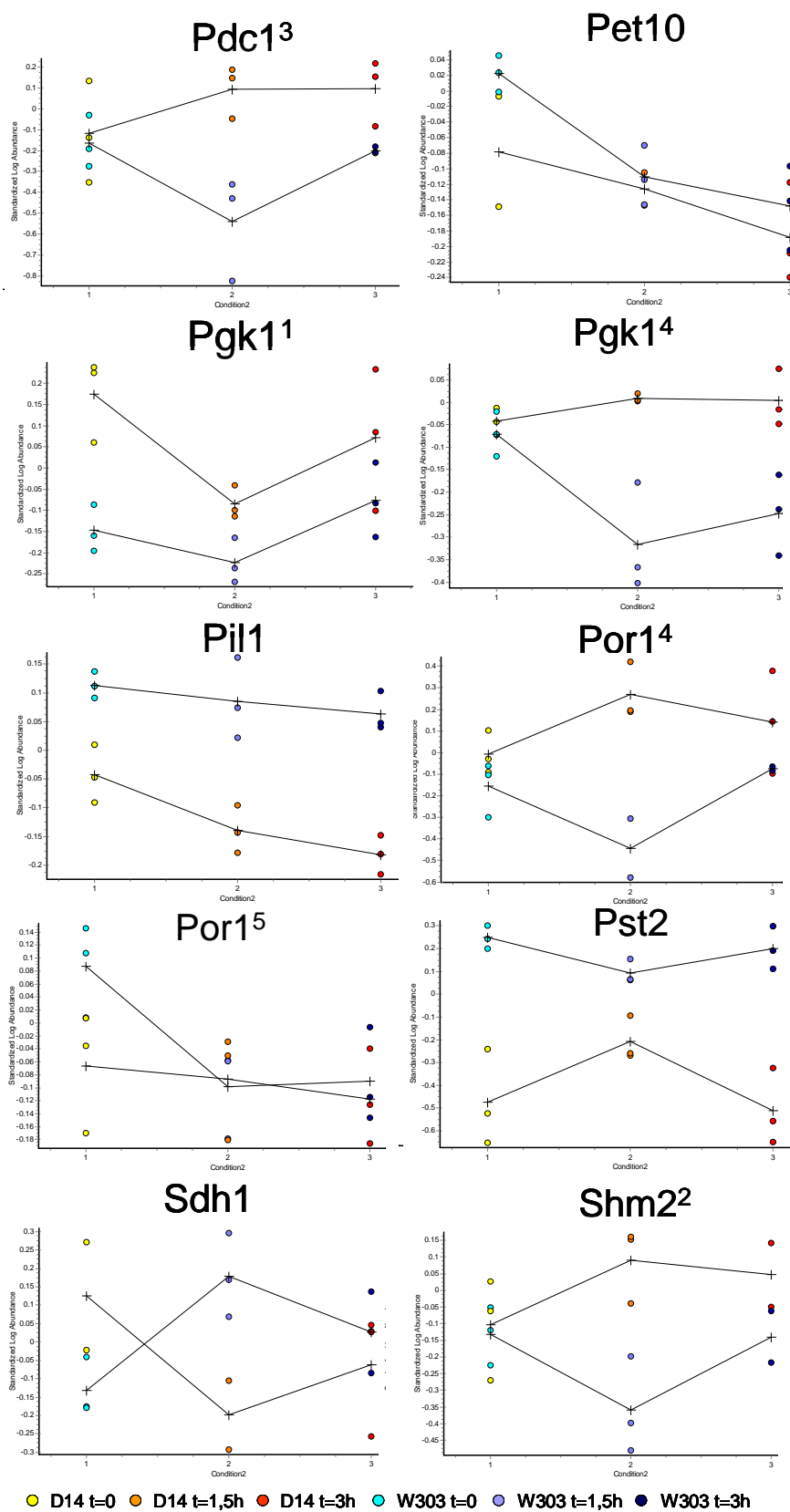


Figura 1. Continuación.

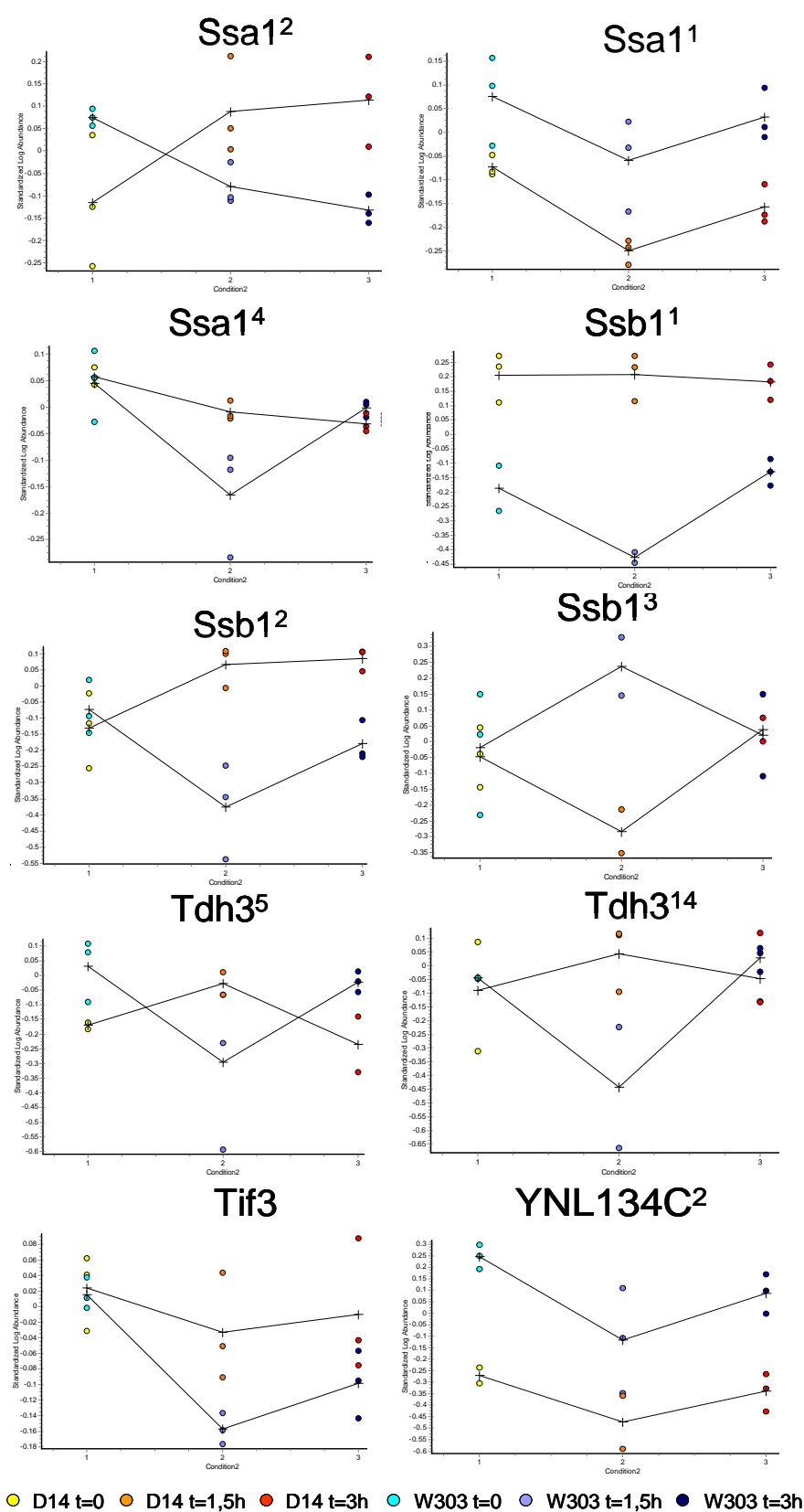


Figura 1. Continuación.

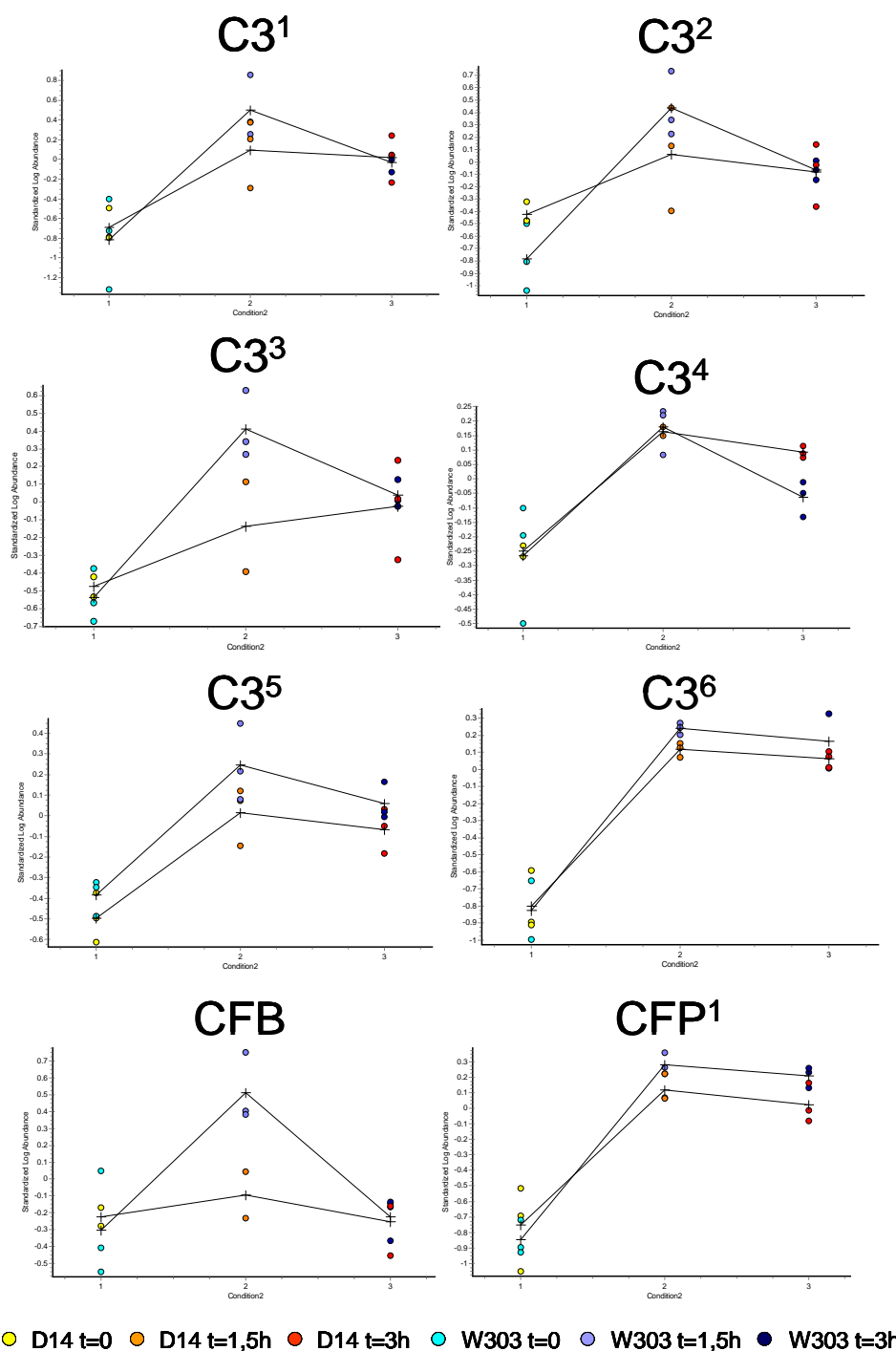


Figura 2. Gráficas que representan el comportamiento de las proteínas humanas en el análisis 2D-DIGE, mostrándose la variación de abundancia en cada cepa a lo largo del tiempo en cada uno de los geles empleados. Se han incluido las proteínas que muestran variación de abundancia en las comparaciones entre múltiples condiciones. Estas imágenes han sido tomadas del *software* DeCyder.

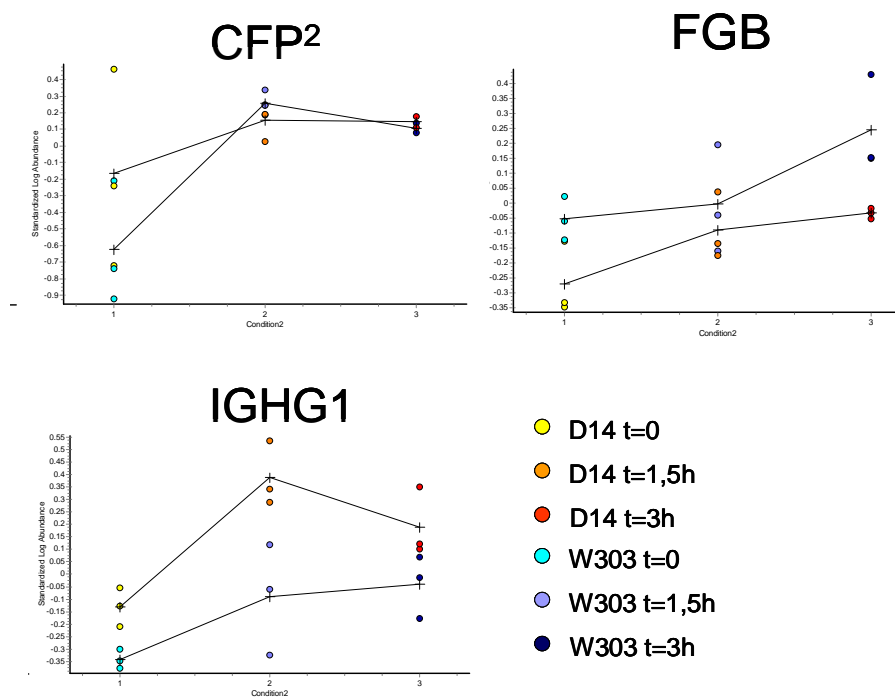


Figura 2. Continuación.

Anexo V.

Tabla 1. Proteínas de la superficie celular de *S. cerevisiae* obtenidas mediante digestión directa de la superficie celular con tripsina e identificadas mediante espectrometría de masas.

Nombre	Descripción	Código de acceso ^a	Péptidos R1 ^b	Score R1 ^c	Péptidos R2 ^b	Score R2 ^c	Péptidos R3 ^b	Score R3 ^c
ORGANIZACIÓN DE LA PARED CELULAR								
Act1	Actina	P22146	5	407.93	6	224.96	7	448.9
Bgl2	Endo-beta-1,3-glucanasa	P05756	8	485.83	4	516.16	8	826.13
Ccw14	Proteína de la pared celular 14 unida covalentemente	P40213	4	291.22	2	222.18	3	303.7
Cis3	Manoproteína de la pared celular CIS3	P35271	2	224.05	3	473.72	4	295.76
Crh1	Glicosidasa CRH1	B3LLJ2	2	64.51	7	266.27	4	308.46
Cwp1	Manoproteína de la pared celular CWP1	P25443	1	31.89	4	222.39	4	247.56
Dse4	Endo-1,3(4)-beta-glucanasa 1	P32827	8	548.72	4	367.72	6	596.7
Ecm33	Proteína de la pared celular ECM33	P26782	3	493.61	3	699.91	3	408.81
Exg1	Exo-beta-1,3-glucanasa de la pared celular	P41058	15	749.09	9	955.56	17	1310.5
Gas1	Beta-1,3-glucanosiltransferasa GAS1	P26786	8	875.34	9	1419.05	11	1429.1
Gas3	Beta-1,3-glucanosiltransferasa GAS3	P48164	6	199.18	7	398.75	8	581.66
Gas5	Beta-1,3-glucanosiltransferasa GAS5	P05754	3	148.73	5	287.58	3	316.6
Hsp150	Manoproteína de la pared celular HSP150	P17079	1	32.72	2	151.48	2	136.36
Mkc7	Proteína GPI aspartil proteasa	Q02753	2	128.31			2	79.91
Psa1	Manosa-1-fosfato guaniltransferasa	P05749	3	91.27	2	29.1	5	137.93
Pst1	Manoproteína de la pared celular PST1	A6ZY20	1	40.69	4	234.74	4	234.56
Pir1	Manoproteína de la pared celular PIR1	O14455	1	38.75	2	126.92	2	119.06
Scw10	Proteína de la pared celular SCW10 relacionada con glucanasas	P09620	4	447.09	5	308.24	7	518.81
Scw11	Proteína de la pared celular SCW11 relacionada con glucanasas	P00729	2	72.27	2	63.55	1	38.66
Scw4	Proteína de la pared celular SCW4 relacionada con glucanasas	P23291	6	343.09	8	1067.64	6	1121.6
Tos1	Proteína TOS1	P00128	3	68.75	1	50.53	4	271.48
Utr2	Quitina transglicosilasa	P38791	1	39.32	2	211.34	2	181.43
Ygp1	Proteína YGP1	P25615	3	166.25	3	286.65	3	413.27
Yps3	Proteína GPI aspártico proteasa	P20436			2	99.28	2	57.98
Zeo1	Proteína ZEO1	P40564	1	33.35	4	78.84	2	52.54
RESPUESTA A ESTRÉS								
Ahp1	Peroxirredoxina tipo-2	P12683	2	107.26	4	136.37	6	531.71
Gpd1	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 1	P53163	2	75.82	3	107.36	3	103.86
Hsp12	Proteína de choque térmico de 12 kDa	P0C0W9	2	236.67	2	364.67	4	131.7
Nsr1	Proteína nucleolar Nsr1	P53221	2	48.93	6	73.22	6	89.91
Sod1	Superóxido dismutasa	B5VL27	3	72.89	4	67.36	1	37.71

Tabla 1. Continuación.

Nombre	Descripción	Código de acceso ^a	Péptidos R1 ^b	Score R1 ^c	Péptidos R2 ^b	Score R2 ^c	Péptidos R3 ^b	Score R3 ^c
Tsa1	Peroxisredoxina TSA1	Q3E823	3	237.87	5	359.9	6	272.46
Ubi4	Poliubiquitina	P40054			4	140.93	2	87.76
Yhb1	Flavohemoglobina involucrada en la desintoxicación de óxido nítrico	P11938	3	101.66	3	176.28	5	193.47
METABOLISMO								
Glicólisis								
Eno1	Enolasa 1	P0C0X0	19	5370.5	13	1617.22	17	5602.9
Eno2	Enolasa 2	P41057	27	6326.8	21	2023.35	27	6762.5
Fba1	Fructosa-bifosfato aldolasa	P26783	9	787.46	5	462.57	11	1639.2
Gpm1	Fosfoglicerato mutasa 1	P05694	6	282.48	8	297.65	9	369.07
Hxk1	Hexokinasa 1	P26784	8	334.83	7	244.3	8	404.45
Hxk2	Hexokinasa 2	P26785	6	176.5	4	80.31	7	201.06
Pfk1	Subunidad alfa de la 6-fosfofructokinasa	P38061	2	109.7	7	256.57	3	129.92
Pfk2	Subunidad beta de la 6-fosfofructokinasa	P05744	2	102.46	5	172.89	4	119.33
Pgi1	Glucosa-6-fosfato isomerasa	P40525	4	363.92	3	26.47	5	582.77
Pgk1	3-Fosfoglicerato kinasa	P39741	28	2042.7	23	1961.72	24	2611.3
Cdc19	Piruvato kinasa 1	P05739	12	654.37	16	663.77	20	1470.2
Tdh1	Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa 1	Q03048			5	243.88	6	393.5
Tdh2	Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa 2	P24031	8	816.42	11	787.22	9	619.21
Tdh3	Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa 3	Q06440	12	1167.7	14	1086.21	14	1450.4
Tpi1	Triosafofosfato isomerasa	P04037	5	289.68	5	325	8	397.03
Metabolismo de carbohidratos								
Ado1	Adenosina kinasa	P25619			3	139.38	2	84.74
Bmh1	Proteína de la familia 14-3-3	P06367	8	403.55	9	230.21	4	173.57
Gnd1	6-fosfogluconato deshidrogenasa	P22147	4	149	1	33.19	5	260.04
Suc2	Invertasa 2	P43621	2	92.72	6	228.3	4	204.76
Tal1	Transaldolasa	P28707	2	74.54	2	76.85	4	165.88
Tkl1	Transketolasa 1	P53852	2	73.17	6	119.32	4	120.6
Fermentación alcohólica								
Adh1	Alcohol deshidrogenasa 1	P38764	10	588.79	10	613.17	13	935.32
Adh2	Alcohol deshidrogenasa 2	P38886	4	186.67			5	420.53
Pdc1	Piruvato descarboxilasa 1	P14126	14	1092.5	12	1053.02	19	1986.1
Metabolismo de aminoácidos								
Aro4	Fosfo-2-desidro-3-desoxiheptonato aldolasa	P26781	1	41.21	3	177.67	2	68.11
Cys3	Cistationina gamma-liasa	P38701	4	187.93	3	203.46	7	275.67
Gln1	Glutamina sintetasa	P05755			4	105.34	2	108.63
Grs1	Glicil-tRNA sintetasa 1	P05318	2	53.31	2	76.87	1	38.51
Gus1	Glutamil-tRNA sintetasa	P05319	2	49.42	4	172.86	2	51.73
His4	Proteína trifuncional de la biosíntesis de histidina	P02400	2	95.68	1	38.34	3	124.2
Ilv5	Ácido quetol reductoisomerasa	P46990	5	191.59	7	126.37	11	327.32
Krs1	Lisil-tRNA sintetasa	P05736	1	25.26	2	47.93	2	36.71
Met6	Homocisteína metiltransferasa	P0C2I0			4	82.4	3	101.66
Sah1	Adenosilhomocisteinasa	P07244	4	143.05	4	135.29	5	148.14

Tabla 1. Continuación.

Nombre	Descripción	Código de acceso ^a	Péptidos R1 ^b	Score R1 ^c	Péptidos R2 ^b	Score R2 ^c	Péptidos R3 ^b	Score R3 ^c
Sam1	S-adenosilmetionina sintetasa 1	P47176	2	116.37	3	106.52	2	113.78
Sam2	S-adenosilmetionina sintetasa 2	P07245	2	139.85			2	136.62
Ses1	Seril-tRNA sintetasa	P19454	1	36.89	3	50.3	2	62.12
Shm2	Serina hidroximetiltransferasa	P25694	3	120.02	10	453.04	8	383.87
Thr4	Treonina sintasa	P28274	2	149.42	1	58.28	2	195.31
Ura2	Proteína URA2	P47120			2	32.42	2	51.73
Vas1	Valil-tRNA sintetasa	P12695	1	63.82	2	75.02	2	105.28
Metabolismo de lípidos								
Fas1	Subunidad beta de la sintasa de ácidos grasos	P05750	7	201.35	5	93.49	12	213.28
Fas2	Subunidad alfa de la sintasa de ácidos grasos	P0CX33	6	345.28	9	230.92	8	483.47
Fas3	Acetil-CoA carboxilasa	P05753	2	53.22	4	66.27	5	76.58
Plb2	Lisofosfolipasa 2	P49166	5	151.75	4	242.5	6	434.51
Plb3	Lisofosfolipasa 3	P49167	3	93.75	4	169.6	4	149.52
Metabolismo de nucleótidos								
Ade1	N-succinil-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribótido sintetasa	Q08193	1	66.64	2	49.58	2	59.35
Ade17	Proteína ADE17 de la biosíntesis de la purina	P38910	2	98.06	4	123.46	8	407.19
Ade5.7	Proteína ADE5.7 de la biosíntesis de la purina	P39990	4	178.59	6	408.17	6	209.28
Adk1	Adenilato kinasa 1	Q99258	1	52.16	4	134.76	3	42.71
Pnc1	Nicotinamidasas	P10664	2	138.74	3	232.59	2	113.53
Vma1	ATPasa vacuolar de membrana VMA1	P07390	3	97.84	3	95.71	4	158.9
Vma2	ATPasa vacuolar de membrana VMA2	P54838			2	63.64	3	141.14
Ade4	Amidofosforribosiltransferasa	P22943			2	42.01	3	50.84
Gua1	GMP sintasa	P10622	2	36.54	2	102.61	1	43.37
Metabolismo de fosfatos								
Ipp1	Pirofosfatasa inorgánica	P07279	3	131.12	4	116.64	4	78.68
Pho3	Fosfatasa ácida	P05745	4	340.1	4	88.19	4	509.13
Síntesis de proteínas								
Asc1	Proteína ribosomal de la subunidad 40S	P48589	5	162.41	4	199.5	4	152.85
Cam1	Factor de elongación 1-gamma 1	Q01855			2	51.94	2	51.25
Efb1	Factor de elongación 1-beta	P0C0T4	2	40.61	1	41.1	4	199.04
Eft1	Factor de elongación 2 (EF-2)	P39938	15	898.65	17	919.49	20	1023.5
Hyp2	Factor de elongación eIF-5A	P05740	3	246.12	3	249.31	3	382.24
Pab1	Proteína de unión a la cola poli(A)	P0C2H6	3	164.02	3	153.55	3	75.57
Rpl10	Proteína ribosomal de la subunidad 60S L10	P05737	6	471.8	7	165.79	6	563.43
Rpl11a	Proteína ribosomal de la subunidad 60S L11-A	P17076	3	92.5	4	238.51	4	137.59
Rpl12a	Proteína ribosomal de la subunidad 60S L12	P29453	4	258.23	3	195.24	4	275.45
Rpl13b	Proteína ribosomal de la subunidad 60S L13-B	P05738	1	20.29	4	118.2	2	55.87
Rpl15a	Proteína ribosomal de la subunidad 60S L15-A	P16861	4	217.6	5	169.55	3	80.05
Rpl16a	Proteína ribosomal de la subunidad 60S L16-A	P16862			2	33.78	2	93.43

Tabla 1. Continuación.

Nombre	Descripción	Código de acceso ^a	Péptidos R1 ^b	Score R1 ^c	Péptidos R2 ^b	Score R2 ^c	Péptidos R3 ^b	Score R3 ^c
Rpl16b	Proteína ribosomal subunidad 60S L16-B	P38720	1	57.92	3	113.38	2	68.08
Rpl17a	Proteína ribosomal subunidad 60S L17-A	P16474			3	237.57	7	330.06
Rpl17b	Proteína ribosomal subunidad 60S L17-B	P07342	3	176.76	3	257.45		
Rpl18a	Proteína ribosomal subunidad 60S L18	P25605	2	100.44	1	117.21	2	118.69
Rpl19a	Proteína ribosomal subunidad 60S L19	P41338	4	222.99	5	227.59	5	242.96
Rpl1a	Proteína ribosomal subunidad 60S L1	Q00955	3	119.54	3	81.38	3	298.36
Rpl20a	Proteína ribosomal subunidad 60S L20	P52910	2	118.63	4	217.94	4	132.25
Rpl21a	Proteína ribosomal subunidad 60S L21-A	P35842	1	58.58	4	134.47	3	128.71
Rpl24a	Proteína ribosomal subunidad 60S L24-A	P19414	2	90.71	2	44.56	2	69.55
Rpl25	Proteína ribosomal subunidad 60S L25	P60010	2	169.05	3	198.74	2	228.94
Rpl26b	Proteína ribosomal subunidad 60S L26-B	P15891	1	45.63	8	173.91	3	45.06
Rpl27a	Proteína ribosomal subunidad 60S L27-A	P21147	3	120.12	5	293.84	3	438.87
Rpl28	Proteína ribosomal subunidad 60S L28	P31787	4	94.64	4	63.5	6	205.8
Rpl2a	Proteína ribosomal subunidad 60S L2	P47143	5	218.59	6	363.17	6	194.48
Rpl3	Proteína ribosomal subunidad 60S L3	P39954	3	212.64	9	319.33	7	309.82
Rpl33a	Proteína ribosomal subunidad 60S L33-A	A6ZY10	1	131.83	3	75.31	2	89.78
Rpl35a	Proteína ribosomal subunidad 60S L35	Q05911	3	191.11	2	78.99	2	110.97
Rpl36b	Proteína ribosomal subunidad 60S L36-B	A6ZRM0	2	106.18	3	155.76	4	184.39
Rpl4a	Proteína ribosomal subunidad 60S L4-A	P18239	8	651.42	4	365.37	9	695.07
Rpl5	Proteína ribosomal subunidad 60S L5	P11076	6	205	6	198.94	6	404.98
Rpl6a	Proteína ribosomal subunidad 60S L6-A	P40825	2	119.33	1	58.99	3	93.95
Rpl6b	Proteína ribosomal subunidad 60S L6-B	P00330	2	150.18	4	118.53	3	100.18
Rpl7a	Proteína ribosomal subunidad 60S L7-A	P00331	2	117.81	5	219.14	9	297.07
Rpl8a	Proteína ribosomal subunidad L8-A	P53296			6	244.87	8	229.17
Rpl8b	Proteína ribosomal subunidad L8-B	Q00764	5	327.92	7	284.7	9	276.72
Rpl9a	Proteína ribosomal subunidad 60S L9-A	P04046	2	102.79	2	74.56	5	218.56
Rpp0	Proteína ribosomal P0	P37302	1	36.15	6	199.28	5	265.55
Rpp2b	Proteína ribosomal P2-beta	P53066	2	105.88	2	193.87	2	91.54
Rps0a	Proteína ribosomal subunidad 40S S0-A	Q05506	6	164.03	3	88.14	4	159.45
Rps10b	Proteína ribosomal subunidad 40S S10-B	P53090	2	102.29	1	56.56	2	102.47
Rps11a	Proteína ribosomal subunidad 40S S11	P47029	5	123.94	4	82.78	3	84.94
Rps12	Proteína ribosomal subunidad 40S S12	P49090	5	212.32	3	146.22	4	181.5
Rps13	Proteína ribosomal subunidad 40S S13	P38707	4	224.37	5	167.77	6	309.14
Rps14a	Proteína ribosomal subunidad 40S S14-A	P13663	1	63.21	5	293.51	4	121.36

Tabla 1. Continuación.

Nombre	Descripción	Código de acceso ^a	Péptidos R1 ^b	Score R1 ^c	Péptidos R2 ^b	Score R2 ^c	Péptidos R3 ^b	Score R3 ^c
Rps15	Proteína ribosomal de la subunidad 40S S15	P32329	3	267.74	3	167.17	4	514.36
Rps16a	Proteína ribosomal de la subunidad 40S S16	P53379	4	135.9	4	249.77	5	252.64
Rps17a	Proteína ribosomal de la subunidad 40S S17-A	Q12303	4	144.91	1	77.02	2	60.48
Rps18a	Proteína ribosomal de la subunidad 40S S18	Q06325	3	118.42	4	269.09	6	111.55
Rps19a	Proteína ribosomal de la subunidad 40S S19-A	P04802	2	84.87	5	151.22	2	72.67
Rps1a	Proteína ribosomal de la subunidad 40S S1-A	P07251	4	145.07	5	123.33	6	194.68
Rps1b	Proteína ribosomal de la subunidad 40S S1-B	P00830	4	156.04	6	131.54	7	235.03
Rps2	Proteína ribosomal de la subunidad 40S S2	B3LGZ3	2	102.81	3	104.38	6	430.19
Rps20	Proteína ribosomal de la subunidad 40S S20	P16965	5	180.12	5	272.66	3	66.11
Rps22a	Proteína ribosomal de la subunidad 40S S22-A	P38766	3	179.91	2	295.7	3	419.7
Rps24a	Proteína ribosomal de la subunidad 40S S24	P15108	4	118.86	5	96.39	4	190.2
Rps3	Proteína ribosomal de la subunidad 40S S3	P02829	8	292.96	9	266.89	13	583.1
Rps4a	Proteína ribosomal de la subunidad 40S S4	A6ZRX0	11	295.76	8	223.79	12	340.23
Rps5	Proteína ribosomal de la subunidad 40S S5	A6ZNQ1	5	479.37	6	595.97	5	1068.5
Rps6a	Proteína ribosomal de la subunidad 40S S6	A6ZT77	5	384.32	4	219	6	230.81
Rps7a	Proteína ribosomal de la subunidad 40S S7-A	A6ZP47	2	93.92	4	59.76	4	244.34
Rps7b	Proteína ribosomal de la subunidad 40S S7-B	A6ZQJ1	1	30.09	3	108.02	3	82.88
Rps8a	Proteína ribosomal de la subunidad 40S S8	A6ZXP4	5	274.81	4	176.95	5	337.96
Rps9b	Proteína ribosomal de la subunidad 40S S9-B	P38009	2	151.15	2	171.39	3	108.45
Tef1	Factor de elongación 1-alfa	Q12127	10	421.85	9	696.87	10	891.69
Tef4	Factor de elongación 1-gamma 2	O13547	4	134.9	4	194.69	6	351.19
Tif1	Factor de iniciación de la traducción eIF4A	P43616	5	225.6	2	80.88	5	397.14
Tif3	Factor de iniciación de la traducción eIF-4B	P32582			3	79.62	2	43.86
Tif45	Factor de iniciación de la traducción eIF4E	P31373	2	58.7	4	147.61	4	50.51
Yef3	Subunidad gamma del factor de elongación eEF1B	P39976	10	371.15	16	889.79	21	1122.4
Proteolisis								
Ape3	Amino peptidasa Y	P46784	2	97.13	4	107.55	5	216.45
Pep4	Aspartil proteasa vacuolar (proteínasa A)	P0C2H8	6	210.39	3	44.04		
Prb1	Proteínasa B vacuolar	P26321	2	52.09	2	93.05	1	32.07
Prc1	Carboxipeptidasa Y	Q02326	3	179.67	7	161.51	7	268.75
DESTINO DE PROTEÍNAS								
Cpr1	Peptidil-prolil isomerasa CPR1	P07280	5	192.03	4	145.87	6	277.82
Cpr6	Peptidil-prolil isomerasa CPR6	B3RHHV0	2	103.21	3	85.38	2	44.1
Hsc82	Chaperona de la familia HSP90	P38861	20	1129.3	22	1196.37	19	1033.1
Hsp10	Proteína de choque térmico de 10 kDa	P53030	4	133.14	2	104.76	1	34.25
Hsp104	Proteína de choque térmico 104	P41805	4	136.35	13	323.46	3	180.91

Tabla 1. Continuación.

Nombre	Descripción	Código de acceso ^a	Péptidos R1 ^b	Score R1 ^c	Péptidos R2 ^b	Score R2 ^c	Péptidos R3 ^b	Score R3 ^c
Hsp26	Proteína de choque térmico 26	P40212	3	80.22	3	165.27	4	179.27
Hsp60	Proteína de choque térmico 60	P36105	8	266.08	11	374.51	11	477.16
Hsp82	Proteína de choque térmico HSP82	P05748	19	1065	22	1186.82	19	985.8
Kar2	ATPasa envuelta en la importación de proteínas al retículo endoplasmático	P05735	5	350.58	17	314.51	7	212.83
Pdi1	Proteína disulfuro isomerasa	P14120	4	170.15	11	620.25	7	484.02
Ssa1	Proteína de choque térmico SSA1	A6ZZG0	17	720.74	16	1087.35	18	950.21
Ssa2	Proteína de choque térmico SSA2	A6ZY20	18	831.48	20	1483.58	20	1258
Ssa4	Proteína de choque térmico SSA4	P28319	12	478.64	11	559.2	8	408.85
Ssb1	Proteína de choque térmico SSB1	A6ZL22	14	737.81	12	595.66		
Ssc1	Proteína de choque térmico SSC1	P09232	6	250.65	8	268.4	6	166.41
Sse1	Proteína de choque térmico SSE1	Q12495	8	315.1	3	229.12	6	282.01
Ssz1	Subunidad SSZ1 del complejo asociado al ribosoma	Q02206	3	125.4	5	114.31	6	107.19
Sti1	Proteína de choque térmico STI1	P00890	8	295.26	8	343.31	4	131.47
OTRAS PROTEÍNAS								
Acs2	Acetil-coenzima A sintetasa 2	P38631	1	48.14	3	45.24	3	70.16
Ald6	Aldehído deshidrogenasa	B3LI22	8	243.84	11	297.8	15	569.18
Cdc48	Proteína 48 del control de la división celular	P02407	1	58.65	3	123.04	5	217.92
Ded1	RNA helicasa DED1 ATP-dependiente	P0C0V8	3	170.59	4	117.13	6	205.08
Dld3	D-lactato deshidrogenasa 3	P0C0W1	2	60.59	1	61.92	5	106.66
Emp47	Proteína EMP47	P35997	2	56.86	3	85.84	1	26.97
Fet3	Ferro-O ₂ -oxidoreductasa	P02365	2	81.75			2	63.18
Gpp1	DL-glicerol-3-fosfatasa 1	P05317	7	316.11	4	134.78	8	226.11
Nop1	Proteína nucleolar NOP1	P04451			3	203.56	4	77.31
Nop56	Proteína nucleolar 56	P04449			3	58.26	3	93.7
Nop58	Proteína nucleolar 58	P04456	1	135.7	2	71.62	2	204.38
Pda2	Componente del complejo piruvato deshidrogenasa	P02406	2	80.18			2	47.94
Pet9	Transportador de ADP/ATP de la membrana interna mitocondrial	P41277	2	95.07	2	32.18	2	78.87
Pma1	ATPasa 1 de la membrana plasmática	P0CX25	11	718.73	8	329.17	7	460.16
Spe3	Espermidina sintasa	B5VL26	1	45.32	3	79.84	2	64.03
Stm1	Proteína supresora STM1	P22137	1	55.82	6	284.49	5	126.87
Sub2	RNA helicasa SUB2 ATP-dependiente	P53622	2	90.44	2	78.5	2	84.66
Tma19	Proteína asociada a ribosomas	P07257	4	168.03	4	262.58	2	134.22
Tpm1	Tropomiosina 1	P00427	4	120.74	8	232.19	3	71.12

^a código de acceso de la base de datos Swiss Prot 57,15; ^b número de péptidos identificados en cada réplica (R1, R2 y R3); ^c medida de la significación estadística de la identificación derivados de los resultados del motor de búsqueda Mascot (MatrixScience; <http://www.matrixscience.com>). Para una mejor visualización de los resultados en cada réplica de las proteínas se han marcado con celdas en verde cuando se han identificado péptidos y en rojo cuando no se han identificado.

Tabla 2. Proteínas humanas obtenidas mediante digestión directa con tripsina de la superficie celular de *S. cerevisiae* tras su incubación con suero humano e identificadas mediante espectrometría de masas.

Nombre	Descripción	Código de Acceso ^a	Péptidos R1 ^b	Score R1 ^c	Péptidos R2 ^b	Score R2 ^c	Péptidos R3 ^b	Score R3 ^c
RESPUESTA INMUNE								
Complemento								
C4BPA	Cadena alfa de la proteína de unión a C4b	P04003	6	148.62			2	118.31
C1QB	Subunidad B del subcomponente de la proteína C1q del complemento	P02746	2	61.76			2	117.02
C1QC	Subunidad C del subcomponente de la proteína C1q del complemento	P02747	2	70.47			3	116.51
C1S	subcomponente de la proteína C1s del complemento	P09871	8	242.26			3	156.44
C3	Proteína C3 del complemento	P01024	88	8755.98	23	1113.15	55	4850.21
C4B	Proteína C4-B del complemento	P0COL5	35	2135.49			9	802.39
C5	Proteína C5 del complemento	P01031	38	1747.14			30	816.84
C7	Proteína C7 del complemento	P10643	3	138.65			2	36.75
C8B	Cadena beta de la proteína C8 del complemento	P07358	16	691.52	1	71.73	8	296.12
C9	Proteína C9 del complemento	P02748	12	675.79			2	86.17
CFB	Factor B del complemento	P00751	17	612.55	1	83.2	9	362.44
Inmunoglobulinas								
IGHG2	Región de la cadena C de la IgG 2	P01859	4	73.81			2	95.41
IGHG4	Región de la cadena C de la IgG 4	P01861	5	152.24			2	122.96
IGHM	Región de la cadena C de la IgM	P01871	7	270.5	3	155	5	242.42
IGKC	Región de la cadena C de la Ig kappa	P01834	2	203.87			3	94.06
COAGULACIÓN								
A2M	Alfa-2-macroglobulina	P01023	29	924.39			18	470.61
F2	Protrombina	P00734	13	752.84			6	312.1
FGA	Cadena alfa del fibrinogeno	P02671	6	341.69	3	187.07	11	749.04
FGB	Cadena beta del fibrinogeno	P02675	5	179.03	2	187.31	15	593.19
FN1	Fibronectina	P02751	39	2179.69	4	250.09	47	4025.27
HRG	Glicoproteína rica en histidinas	P04196	12	625.93	5	265.25	5	262.65
KNG1	Kininogeno-1	P01042	12	428.35	1	43.99	7	109.01
PLG	Plasminógeno	P00747	38	1944.42	2	60.33	9	313.59
SERPINA1	Alfa-1-antitripsina	P01009	25	37156.55	3	214.03	23	5190.95
SERPIND1	Cofactor 2 de heparina	P05546	16	657.61	1	108.96	6	203.68
SERPINF2	Alfa-2-antiplasmina	P08697	8	435.48			2	88.99
RESPUESTA A ESTRÉS								
HSP90AB1	Proteína de choque térmico HSP 90-beta	P08238	3	148.04	3	197.8	3	114.87
HSPA1A	Proteína de choque térmico de 70 kDa 1A/1B	P08107	2	75.72	2	156.73		
HSPA1L	Proteína de choque térmico de 70 kDa 1-like	P34931	4	178.85	3	212.3	4	185.25
HSPA8	Proteína similar a la de choque térmico de 71 kDa	P11142	3	187.18			4	250.24

Tabla 2. Continuación.

Nombre	Descripción	Código de Acceso ^a	Péptidos R1 ^b	Score R1 ^c	Péptidos R2 ^b	Score R2 ^c	Péptidos R3 ^b	Score R3 ^c
METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS								
APOA1	Apolipoproteína A-I	P02647	28	16123.42	4	188.29	24	2423.2
APOA2	Apolipoproteína A-II	P02652	3	316.41			3	225.49
APOA4	Apolipoproteína A-IV	P06727	27	1758.65			2	128.13
APOB	Apolipoproteína B-100	P04114	108	5649.95	2	66.09	89	4486.15
APOE	Apolipoproteína E	P02649	12	507.04	3	144.12	7	264.8
APOL1	Apolipoproteína L1	O14791	7	351.23			3	96.62
CLU	Clusterina	P10909	9	333.93	1	68.01	4	284.92
QUERATINAS								
KRT1	Queratina tipo II de citoesqueleto 1	P04264	9	377.73	13	605.61	17	947.18
KRT10	Queratina tipo I de citoesqueleto 10	P13645	6	184.02	10	670.79	11	761.1
KRT2	Queratina tipo II de citoesqueleto 2	P35908	4	82.59	9	445.74	4	219.42
KRT6B	Queratina tipo II de citoesqueleto 6B	P04259			3	125.74	3	81.76
KRT9	Queratina tipo I de citoesqueleto 9	P35527	4	93.47	7	472.92	12	603.14
OTRAS PROTEÍNAS								
A1BG	Alpha-1B-glicoproteína	P04217	10	482.51			6	291.6
ACTB	Actina citoplasmática 1	P60709	6	279.21	4	187	5	269.6
ACTC1	Actin alfa de músculo cardíaco 1	P68032	3	141.86			5	181.74
AGT	Angiotensinogeno	P01019	10	574.76			7	314.94
AHSG	Alfa-2-HS-glicoproteína	P02765	6	374.25			2	142.75
ALB	Albumina sérica	P02768	53	7885.97	14	798.39	44	4646.61
AMBP	Proteína AMBP	P02760	4	115.26			2	42
CP	Ceruloplasmina	P00450	29	2060.32			23	1249.63
EEF1A1	Factor de elongación 1-alfa 1	P68104	3	110.57	3	249.67	2	117.36
FCN3	Ficolina-3	O75636	2	65.2			2	44.69
GC	Proteína de unión a la Vitamina D	P02774	15	1638.93			9	852.75
GSN	Gelsolina	P06396	16	816.1			6	325.19
HBA1	Subunidad alfa de la hemoglobina	P69905	6	268.11			3	109.7
HBB	Subunidad beta de la hemoglobina	P68871	7	457.62	1	39.34	4	181.42
HIST1H4A	Histona H4	P62805	3	95.26	1	33.19		
HP	Haptoglobina	P00738	19	1363.99	2	75.32	17	1033.64
HPR	Proteína relacionada con la haptoglobina	P00739	14	770.81			8	402.29
HPX	Hemopexina	P02790	15	941.96	1	48.79	11	451.97
IGFALS	Subunidad lábil a ácidos del complejo proteico de unión al factor de crecimiento tipo insulina	P35858	8	562.03			3	218.48
ITI1H1	Cadena pesada H1 del inhibidor inter-alfa-tripsina	P19827	12	841.44	1	66.82	9	402.66
ITI1H2	Cadena pesada H2 del inhibidor inter-alfa-tripsina	P19823	16	853.53	2	86.09	12	662.13
ITI1H4	Cadena pesada H4 del inhibidor inter-alfa-tripsina	Q14624	13	503.8			4	186.27
PGLYRP2	N-acetilmuramoi-L-alanina amidasa	Q96PD5	7	207.75			4	178.98
PON1	Paraoxonasa/arilesterasa 1 serica	P27169	9	1251.99			6	431.57

Tabla 2. Continuación.

Nombre	Descripción	Código de Acceso ^a	Péptidos R1 ^b	Score R1 ^c	Péptidos R2 ^b	Score R2 ^c	Péptidos R3 ^b	Score R3 ^c
RPS13	Proteína ribosomal S13 de la subunidad 40S	P62277	2	75			2	81.12
SERPINA3	Alfa-1-antiquimotripsina	P01011	8	587.46			4	201.04
SERPINF1	Factor derivado de epitelio pigmentado	P36955	9	653.03			3	77.78
SLC4A1	Proteína transportadora de aniones de la banda 3	P02730	12	582.92			3	183.26
TF	Serotransferrina	P02787	13	356.47			3	46.38
THBS1	Trombospondina-1	P07996	19	617.39			4	115.9
TTR	Transtiretina	P02766	4	185.47			5	485.43
VTN	Vitronectina	P04004	9	537.27			6	341.68

^a código de acceso de la base de datos Swiss Prot 57,15; ^b número de péptidos identificados en cada réplica (R1, R2 y R3); ^c medida de la significación estadística de la identificación derivados de los resultados del motor de búsqueda Mascot (MatrixScience; <http://www.matrixscience.com>). Para una mejor visualización de los resultados en cada réplica de las proteínas se han marcado con celdas en verde cuando se han identificado péptidos y en rojo cuando no se han identificado.

Anexo VI.**Publicaciones derivadas de la presente tesis doctoral:**

-Llopis S, Hernández-Haro C, Monteoliva L, Querol A, Molina M, Fernández-Espinar MT. Pathogenic potential of *Saccharomyces cerevisiae* strains of isolated from dietary supplements. Enviado a PLOS ONE.

-Hernández-Haro C, Llopis S, Monteoliva L, Gil C, Molina M. Immunoproteomics profiling of *Saccharomyces* systemic infection in a murine model. Manuscrito para ser enviado a Journal of Proteomics.

-Hernández-Haro C, Molero G, Monteoliva L, Gil C, Molina M. Protein expresión profile of *Saccharomyces cerevisiae* in human blood. Manuscrito en preparación.

Participación en otras publicaciones durante el desarrollo de este trabajo:

-Guarner F, Requena T, Marcos A. Consensus statements from the Workshop "Probiotics and Health: Scientific Evidence" Nutrición Hospitalaria, 25(5), 700-704. Junio 2010. Participante como firmante del consenso: Carolina Hernández Haro.

-de Llanos R, Hernández-Haro C, Barrio E, Querol A, Fernández-Espinar MT, Molina M. Título: Differences in activation of MAP kinases and variability in the polyglutamine tract of Slt2 in clinical and non-clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 27(8), 549-561, Agosto 2010.

-Martínez-Martínez S, Frandoloso R, Rodríguez Ferri EF, Gil C, Hernández-Haro C, Yubero S, Gutiérrez Martín CB. Immunoproteomic analysis of the protective response obtained with subunit and comercial vaccines against Glässer's disease in pigs. Veterinary Immunology and Immunopathology, 151, 235-247, Noviembre, 2012.